



Centro de Investigación Científica
de Yucatán, A.C.



Posgrado en Ciencias Biológicas

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA
ESTERASA PROVENIENTE DEL ACUÍFERO DE
YUCATÁN**

Tesis que presenta

SERGIO RAMOS JIMÉNEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Opción Biotecnología

Mérida, Yucatán, México

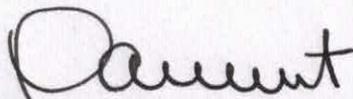
2016

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



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Sergio Ramos Jiménez** titulado **IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA ESTERASA PROVENIENTE DEL ACUÍFERO DE YUCATÁN**, fue realizado en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Blondy Canto Canché, dentro de la opción de Biotecnología perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.
Atentamente.



Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 30 de Junio 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 a 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: _____



Sergio Ramos Jiménez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado "APROVECHAMIENTO SUSTENTABLE DEL ACUÍFERO DE YUCATÁN MEDIANTE TECNOLOGIA METAGENÓMICA PARA LA BÚSQUEDA DE PRODUCTOS BIOTECNOLÓGICOS CON POTENCIAL DE ALTO IMPACTO ECONÓMICO" FOMIX-YUCATÁN 165026 en el que participe bajo la dirección de la Dra. Blondy Canto Canché.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada (#308164) para la realización de estudios de Maestría en Ciencias Biológicas opción Biotecnología.

Al financiamiento del proyecto “APROVECHAMIENTO SUSTENTABLE DEL ACUÍFERO DE YUCATÁN MEDIANTE TECNOLOGIA METAGENÓMICA PARA LA BÚSQUEDA DE PRODUCTOS BIOTECNOLÓGICOS CON POTENCIAL DE ALTO IMPACTO ECONÓMICO” FOMIX-YUCATÁN 165026 y por el financimientto a la asistencia del Noveno congreso Nacional del IPN, llevado acabo en Tlaxcala en octubre de 2014.

A la Dra. Blondy Canto Canche por haber dirigido esta tesis, gracias por su comprensión y apoyo y motivación constante. Al comité tutorial conformado por la Dra. Aileen O’Connor, Alejandra Prieto, Luis Sáenz gracias por sus observaciones a lo largo del periodo de maestría.

Al M.C. Bartolomé Chi Manzanero por su apoyo técnico en la parte de la identificación y clonación de la proteína, por sus consejos y amistad.

Al M.C. Miguel Tzéc por su apoyo técnico y por ayudarme a tomar las fotos de mis experimentos y por su amistad.

Al Dr. Cesar de los Santos Briones por su apoyo técnico en la purificación de la proteína.

Al M.C. Max Apolinar Hernández por su apoyo técnico en los análisis bioinformáticos.

Al Dr. Humberto Ramírez y al M.C. Miguel Marfil por sus consejos para los análisis de filogenia.

Al Dr. Jorge Santamaría y al M. C. Francisco Espadas por haberme permitido usar el espectrofotómetro DU650 para realizar los ensayos enzimáticos.

A la M.C. Lizbeth Castro por haberme capacitado para usar el espectrofotómetro DU800.

A la Dra. Marcela Gamboa y a la M.C. Leticia Medina por prestarme sus instalaciones para usar el sonicador.

DEDICATORIAS

A Dios por haberme permitido recorrer este camino y por acompañarme en todo momento.

A mi padre, a pesar de que físicamente no estas, sé que siempre me has acompañado y estarías orgulloso de mi.

A mi madre y hermano por su motivación, consejos, y apoyo en todo momento.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Miguel Canseco Pérez, Jaime Castro, Muhiland Yamily Burgos Canul, Inés Arana Guevara, Jaime Muñoz López, Isaura, Abraham Obrador, Gisel Carreón, Luis Barrales, Helio Mendoza, Hever Usiel, a todos muchas gracias por su apoyo, compañerismo y amistad.

A mis amigos de otros laboratorios en especial a María José, Ruth Márquez, Caleb Juárez, Laura y Roberto Jusseff.

Finalmente a todos que de alguna contribuyeron a la realización de esta tesis.

Muchas gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
Índice de figuras.....	IV
ÍNDICE DE CUADROS.....	IX
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES.....	5
1.1.1 Esterasas y lipasas.....	5
1.1.2 Estructura y mecanismo de acción.....	6
1.1.3 Diferencias entre lipasas y esterazas.....	7
1.2 Aplicaciones biotecnológicas.....	8
1.3 Propiedades fisicoquímicas de interés industrial de esterazas.....	9
1.4 Metagenómica.....	11
1.5 Antecedentes de la biblioteca metagenómica del Acuífero de Yucatán.....	14
1.6 Identificación de clonas con actividad de esterazas.....	14
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	17
JUSTIFICACIÓN.....	18
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	21
2.1. INTRODUCCIÓN.....	23.
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28

2.2.1	Diseño de cebadores	28
2.2.2	Estandarización de la Reacción en Cadena de la polimerasa	28
2.2.3	Clonación de los productos de PCR en el vector TOPO TA.....	28
2.2.4	Secuenciación y análisis de secuencias	29
2.2.5	Subclonación en el vector de expresión pLATE.....	29
2.2.6	Verificación de la clonación.....	30
2.2.7	Análisis funcional en placas de LB y tributirina	31
2.2.8	Análisis de expresión de la proteína en un cultivo líquido	31
2.2.9	Cuantificación de proteínas totales	32
2.2.10	Purificación de la proteína EstAS3B: Monitoreo de actividad mediante ensayo de difusión en discos	32
2.2.11	Electroforesis de Proteínas (Análisis SDS-PAGE).....	32
2.2.12	Caracterización bioquímica de EstAS3B	33
2.2.13	Determinación de longitud de cadena (sustrato preferido)	33
2.2.14	Determinación de los parámetros cinéticos	34
2.2.15	Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima.....	34
2.2.16	Estabilidad en diferentes temperaturas.....	34
2.2.17	Efecto del pH sobre la actividad de la enzima	34
2.2.18	Caracterización <i>in silico</i> de EstAS3B	35
2.2.19	Predicción de péptido señal y dominios transmembranales	35
2.2.20	Análisis filogenético de EstAS3B	35
2.2.21	Modelamiento molecular de EstAS3B.....	35
2.3.	RESULTADOS	36

2.3.1	Diseño de cebadores	36
2.3.2	Correlación de los genes de esterasas identificados con la clona metagenómica.....	38
2.3.4	Subclonación en el vector de expresión pLATE.....	40
2.3.5	Verificación de la clonación.....	41
2.3.6	Análisis funcional en placas de LB y tributirina	44
2.3.7	Análisis de expresión de la proteína en un cultivo líquido	46
2.3.8	Cuantificación de proteínas por el método BCA (Ácido bicinónico)	48
2.3.9	Electroforesis de Proteínas (SDS-PAGE)	49
2.3.10	Caracterización bioquímica de EstAS3B	50
2.3.11	Determinación de longitud de cadena (sustrato preferido)	51
2.3.12	Determinación de los parámetros cinéticos	51
2.3.13	Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima.....	52
2.3.14	Estabilidad en diferentes temperaturas.....	53
2.3.15	Efecto del pH sobre la actividad de la enzima	54
2.3.16	Caracterización <i>in silico</i> de EstAS3B	55
2.3.17	Análisis BLASTX	55
2.2.18	Predicción de péptido señal y dominios transmembranales	58
2.2.19	Análisis filogenético de EstAS3B	59
2.2.20	Modelamiento molecular de EstAS3B.....	65
	DISCUSIÓN	71
	<i>coNclusiones y perspectivas</i>.....	79
	<i>conclusiones</i>.....	79
	<i>perspectivas</i>	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Reacciones catalizadas por esterasas: a) Hidrólisis, b) Esterificación y c) Transesterificación (Levisson et al., 2009)..... 6

Figura 1.2. Plegamiento α/β hidrolasa de lipasas y esterasas. Hojas β mostradas en flechas en azul (1-8), α hélices mostradas en rojo (A-F). Las posiciones relativas de la triada catalítica se indican en círculos rojos (Figura basada en Jochens *et al.*, (2011) y Bornscheuer (2002)..... 7

Figura 1.3. Propiedades valiosas que determinan su potencial como biocatalizadores industriales. Modificado de López *et al.*, 2014..... 10

Figura 1.4. Construcción y análisis de bibliotecas metagenómicas para el descubrimiento de enzimas (modificada de Handelsman *et al.*, 2007)..... 12

Figura 1.5. Escrutinio funcional de la biblioteca metagenómica del Acuífero de Yucatán sobre medio LB sólido con tributirina. Una colonia muestra el halo claro, indicativo de la actividad de esterasa..... 15

Figura 2.1. Vector de expresión elegido para la sobreexpresión del gen de esterasa en el presente trabajo..... 27

Figura 2.2. ADNs de los fósmidos identificados funcionalmente conteniendo esterasas, M, Marcador de Masa molecular, 1-12 números asignados arbitrariamente a los fósmidos que presentaron actividad..... 38

Figura 2.3 A. Identificación de clonas que contienen los marcos de lectura de esterasas en las muestras secuenciadas por pool. Los cebadores usados para identificar los EstAS3A, EstAS3B y EstAS2 fueron nombrados inicialmente EstAS3A, EstAS3B y EstAS8, respectivamente. M, Marcador de masa molecular..... 39

Figura 2.3 B. Identificación de clonas que contienen los marcos de lectura de esterasas en las muestras secuenciadas por pool. Los cebadores usados para identificar los EstAS2 y

EstAS10 fueron nombrados inicialmente, EstAS8 y EstAS10, respectivamente. M, Marcador de masa molecular..... 39

Figura 2.4. Amplificación de los marcos de lectura completos de los genes de esterasas identificados en las clonas metagenómicas en este trabajo. Carriles 1 y 2, EstAS2; carriles 3 y 4, EstAS3A; carriles 5 y 6, EstAS3B; carril 7, EstAS10; M, marcador de masa molecular. 40

Figura 2.5. Productos de PCR purificados con el kit “Gel Extraction” de QIAGEN. Carril 1, EstAS2; carril 2, EstAS3A; carril 3, EstAS3B; carril 4, EstAS10; M, marcador de masa molecular 41

Figura 2.6 A. Análisis por PCR en colonia de las clonas en pLATE conteniendo los ORFs. Carriles 1-3, EstAS2; Carriles 4-6, EstAS3A, carril (-), control negativo de PCR. M, marcador de masa molecular. 41

Figura 2.6 B. Análisis por PCR en colonia de las clonas en pLATE conteniendo los ORFs. Carriles 1-3, EstAS3B y carriles 4-6, EstAS10. M, marcador de masa molecular..... 42

Figura 2.7. Verificación de la clonación en el vector de expresión pLATE mediante PCR de los ORFs carril 1, EstAS2; carril 2, EstAS3A; carril 3, EstAS3B; carril 4, EstAS10, carril 5, CAT (cloranfenicol acetil transferasa) a partir de los ADN plasmídicos purificados y usados como templado, carril 6, control negativo de PCR; M, marcador de masa molecular. 43

Figura 2.8. Digestión con las enzima XbaI y StuI de los constructos en el vector pLATE liberándose los insertos respectivos: carril 1, EstAS2; carril 2, EstAS3A; carril 3, EstAS3B, carril 4, EstAS10; carril 5, CAT (Cloranfenicol acetil transferasa). M, marcador de masa molecular. 44

Figura 2.9. Análisis funcional de actividad esterasa de la clona en el sistema de expresión aLICator pLATE-EstAS3B. La clona fue cultivada sobre LB-tributirina-ampicilina A) inducción con 0.1 mM de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG); B) sin IPTG, y C) Cepa BL21 silvestre, sin vector, empleada como control negativo, D) clona en el sistema de

expresión aLICator conteniendo el gen de la cloranfenicol acetil transferasa en el vector pLATE (segundo control negativo)..... 45

Figura 2.10 Análisis funcional de actividad de esterasa de las clonas en el vector de expresión pLATE de los ORFs EstAS2, Est3A, EstAS10 A) medio LB con tributirina (sustrato), ampicilina (selector) e IPTG (inductor de expresión). B) idéntico a A, pero sin inductor..... 46

Figura 2.11. Ensayo de actividad de esterasa en difusión en placa de EstAS3B durante el proceso de purificación. Panel A; corresponde a las fracciones colectadas durante la purificación, 1-3 fracciones que eluyeron inmediatamente después de agregar el extracto lisado a la columna de níquel; 4-7 fracciones colectadas después de agregar el buffer de lavado, 8-20 fracciones colectadas después de agregar el buffer de elución, el cual contenía una alta concentración de imidazole (250 mM). Panel B; extracto lisado de pLATE-EstAS3B; inducido con 0.1 mM de IPTG y B2 sin inducir. Panel C, extracto lisado de BL21 (D3) empleado como control negativo 47

Figura 2.12. Análisis funcional de actividad de esterasas mediante ensayo de difusión en placas (papel filtro sobre medio selectivo para detección de esterasas. Los ensayos 1, 2 y 3 corresponden al extracto soluble después de la lisis celular de las clonas con los genes EstAS2, Est3A y EstAS10 respectivamente. Panel A, se indujo con 0.1 mM de IPTG; B) sin inducir..... 48

Figura 2.13. Análisis SDS-PAGE de la purificación del perfil de proteínas durante la purificación de EstAS3B. Se cargó 10 µg de proteína por carril y al final de la electroforesis el gel fue teñido con Coomassie Blue. Carril M, Marcador de masa molecular de proteínas; carril 1, extracto proteico del lisado de la cepa silvestre BL21 (DE3), carril 2, extracto proteico del lisado de pLATE- EstAS3B sin inducir; carril 3, extracto proteico del lisado de pLATE- EstAS3B inducido con 0.1 mM de IPTG; carril 4, flujo obtenido después de agregar el extracto proteico de EstAS3B a la columna (proteína que no logro unirse a la columna); carril 5, lavado, carriles 6-9 fracciones obtenidas de la proteína purificada en columna de níquel..... 50

Figura 2.14. Curva estándar del p-nitrofenol (pNP) usando un volumen de 1 ml de cada

concentración disuelto en 10 % de isopropanol y ajustando el volumen de 1ml con el amortiguador fosfato de sodio pH 7.5.	50
Figura 2.15. Determinación de la especificidad de EstAS3B por el sustrato, empleando diferentes pNP-ésteres.	51
Figura 2.16. Comportamiento cinético de la enzima EstAS3B, graficado con el software GraphPad.	52
Figura 2.17. Actividad de esterasa de EstAS3B evaluada en diferentes temperaturas....	53
Figura 2.18. Actividad residual de esterasa de EstAS3B después de 30 minutos de incubación en diferentes temperaturas.	54
Figura 2.19. Efecto del pH sobre la actividad de esterasa de EstAS3B .Amortiguador acetato de sodio (pH 5-6), fosfato de sodio (pH 6.5-7.5), tris (pH 8-9), carbonato (pH 9.5-10).	54
Figura 2.20. Mapa del inserto de fósmino 3, mostrando 30 marcos de lectura abiertos, identificados usando el software Geneious 7.1. El marco de lectura abierto 30, sombreado en negro, representa la esterasa EstAS3B.	55
Figura 2.21. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de EstAS3B con proteínas relacionadas de la familia IV y VII. Motivo I corresponde al agujero oxianión; motivo II corresponde al pentapéptido en el cual se encuentra la serina catalítica; motivo III corresponde al residuo ácido; motivo IV corresponde a la histidina catalítica y el motivo V es una nueva secuencia conservada en la familia IV identificada por Kim <i>et al.</i> , (2015). .	60
Figura 2.22. Relaciones filogenéticas de proteína EstAS3B con miembros de la familia IV y VII, con las cuales presenta homología. EstAS3B es un nuevo miembro de un clado hermano de la familia IV de esterases. Árbol obtenido por Neighbor Joining y Bootstrap de 1000. Las distancias evolutivas fueron calculadas empleando el método de corrección de Poisson. El análisis evolutivo fue realizado en MEGA 6.....	61
Figura 2.23. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de EstAS3B con proteínas	

relacionadas de la familia IV y VII y dienolactonas verdaderas. 63

Figura 2.24. Relaciones filogenéticas de proteína EstAS3B con los miembros de las 15 familias de enzimas lipolíticas. EstAS3B junto con las dienolactonas hidrolasas forman un clado cercano a las familias IV y VII. Árbol obtenido por Neighbor Joining y Bootstrap de 1000. Las distancias evolutivas fueron calculadas empleando el método de corrección de Poisson. El análisis evolutivo fue realizado en MEGA 6..... 65

Figura 2.25 A. Superposición de los 5 modelamientos propuestos por el servidor I Tasser para la proteína EstAS3B y sobrepuesto con el modelo del templado (secuencia 4Q3K). El cuadro de acercamiento (“close up”) muestra los residuos de la triada catalítica, Ser188, Asp237, His268. El modelamiento de I-TASSER fue abierto con el programa Pymol. 66

Figura 2.25 B. Representación de EstAS3B (Azul) superpuesto sobre la estructura de la esterasa 4Q3K: A (Rojo). Los residuos catalíticos se encuentran marcados en el recuadro de acercamiento en el cual se indica primero la posición del aminoácido en EstAS3B y luego la posición de ese aminoácido en 4Q3K: A..... 66

Figura 2.25 C. Análisis del modelamiento con el servidor I-Tasser y visualizado con el software Pymol, mostrando la triada catalítica S188-D237-H268. En el lado derecho se muestra la estructura de la proteína 4Q3K y en el lado izquierdo la posible estructura de la proteína en estudio, revelando la conservación del plegamiento α/β hidrolasa. 67

Figura 2.25 D. Comparación de estructuras, mostrando en azul la superficie de EstAS3B, en rojo se muestra la representación de la superficie de la estructura usada como templado (4Q3K). En la figura de la izquierda el rojo resalta el sitio activo (serina catalítica 188) en EstAS3B y en la figura de la derecha el azul resalta el sitio activo (la serina catalítica 113) en 4Q3K. 68

Figura 2.25 E. Representación estructural de la proteína EstAS3B generado por I-Tasser y visualizado con Pymol. Conservación del plegamiento α/β hidrolasa. N, es extremo amino terminal y C, extremo carboxilo terminal. La estructura consta de seis alfa hélices enlazadas por ocho láminas betas. En el recuadro de la derecha se muestra el sitio catalítico conservado de la esterasa, el cual consiste de Ser188-D237-H268. Las esferas marcadas

en naranja muestran los aminoácidos que representan el agujero oxianión, el cual se encuentra cerca del sitio activo (como se muestra en el cuadro de acercamiento). 69

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Diferencias entre lipasas y esterases basado en sus propiedades catalíticas (Kapoor y Gupta 2012; Bornscheuer 2002)..... 8

Cuadro 1.2. Identificación y aislamiento de enzimas durante el periodo 2007 a 2009 a partir de metagenomas (modificado de Uchiyama *et al.*, 2009)..... 13

Cuadro 2.1 Vectores y características de los genes clonados..... 24

Cuadro 2. 2 .Cebadores usados en este trabajo para la clonación del gen de interés en el vector pLATE..... 36

Cuadro 2.3. Concentraciones de ADNs de los fósmidos. 38

Cuadro 2.4. Preparación de las clonas para su envío a secuenciación 39

Cuadro 2.5. Proteínas cuantificadas método de BCA (Ácido bicinconínico) 49

Cuadro 2.6. Proteínas deducidas a partir de los marcos de lectura abiertos identificados por el programa GLIMMER y función deducida basada en homología (software Geneious 7.1) en el contig perteneciente al fósido 3 metagenómico en este estudio..... 55

Cuadro 2.7. Marcos de lectura abiertos encontrados en las clonas seleccionadas funcionalmente 58

Cuadro 2.8. Predicción de Péptido señal, Dominios transmembranales y Peso molecular 59

Cuadro 2.9. Comparación de motivos importantes en las esterases EstAS3B, 4Q3K y otras proteínas relacionadas..... 62

RESUMEN

Las esterases son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces éster y son ampliamente diversas en sus propiedades enzimáticas y especificidad de sustrato, lo cual las hace muy atractivas para la industria alimentaria, formulaciones de detergentes, papel, etc. En las últimas décadas las técnicas metagenómicas han permitido acceder a la diversidad genética de los microorganismos directamente de su ambiente, gracias a ello se han descubierto nuevas enzimas. En el CICY se generó una biblioteca metagenómica a partir de una muestra del Acuífero de Yucatán, se clonó el ADN metagenómico en el fósido pCC2fos y se transformó en la cepa *E. coli* Epi300 (Epicentre). Se identificaron 12 clonas con actividad de esterasa y éstas fueron secuenciadas. El análisis *in silico* permitió identificar 4 marcos de lectura abiertos de esterases a partir de 3 clonas que dieron resultado positivo en el escrutinio funcional de esterases. En una de estas clonas denominada Fos 3, se identificó un ORF con 91% de identidad con una esterasa de *Sphingobium yanoikuyae*. La caracterización *in silico* reveló que el ORF EstAS3B posiblemente pertenece a una nueva subfamilia dentro de la familia IV o a una nueva familia y que posee el pentapéptido GFSAG. El modelamiento de EstAS3B indica que es un homólogo estructural de una esterasa metagenómica anotada en la base de datos de proteínas como 4Q3K: A; Así mismo el análisis estructural bioinformático permitió predecir la posible aplicación de la enzima, ya que se identificó la secuencia GAA en el agujero oxianión y esta secuencia se relaciona con enzimas que actúan sobre alcoholes terciarios; este tipo de esterases tienen un nicho en la síntesis de fármacos. Por otro lado, en la caracterización cinética se determinó una K_m de 0.14 mM, temperatura óptima de 40 °C y pH óptimo de 7.5, actuando también a pH básico. Estos valores se encuentran en el rango de las enzimas comerciales. Sus parámetros cinéticos junto con sus características estructurales hacen de esta proteína, una enzima interesante por ser novedosa y por su potencial de aplicación en la industria farmacéutica.

ABSTRACT

Esterases are the enzymes that catalyze the hydrolysis of ester bonds; which are widely diverse in its enzymatic properties and substrate specificity. These properties makes them very attractive for the food industry, detergent formulations, paper, etc. In recent decades the metagenomic techniques have allowed access to the genetic diversity of microorganisms directly from their environment, in this manner new enzymes have been discovered. In CICY, a metagenomic library was generated from Yucatan aquifer sample. The metagenomic DNA was cloned into Fosmid Vector (pCC2fos) and transformed into *E. coli* strain EPI300 (Epicentre). Twelve clones with esterase activity were identified and then sequenced. *In silico* analysis allowed to identify four esterase open reading frames (ORFs) from three clones that gave positive results in the functional esterase scrutiny. Within those clones, one named as Fos 3 having an ORF which has 91% identity with *Sphingobium yanoikuyae* esterase. The *in silico* characterization revealed that EstAS3B ORF maybe belong to a new subfamily (within the family IV) or a new family and having GFSAG pentapeptide. EstAS3B modeling indicates that a structural homologue of a metagenomic esterase annotated in the protein database as 4Q3K: A; Similarly, bioinformatic structural analysis allowed predict the possible application of the enzyme, since the GAA sequence was identified in the oxyanion hole. This sequence is related to the enzymes that acts on tertiary alcohols. This type of esterases has a major role in the synthesis of drugs .Besides, the kinetic characterization was determined as Km of 0.14 mM, optimum temperature of 40 ° C and optimum pH of 7.5, and these enzymes could acts well also in basic pH. These values were found in the commercial enzymes. Their kinetic parameters and structural features made them an interesting enzyme and this innovation could be a potential application in the pharmaceutical industry.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas lipolíticas, incluyen estererasas (EC 3.1.1) y lipasas (EC 3.1.1.3); son hidrolasas de ésteres carboxílicos que catalizan el corte y formación de enlaces éster. Las estererasas hidrolizan enlaces éster de ácidos grasos cadena corta (≤ 10 carbonos), los cuales son solubles en agua, mientras que las “lipasas verdaderas” muestran su máxima actividad hacia los enlaces éster de ácidos grasos de cadena larga (> 10 carbonos). (Arpigny y Jaeger, 1999). Ambas, lipasas y estererasas, pertenecen a la superfamilia α/β hidrolasa y su actividad catalítica se basa sobre una triada catalítica formada generalmente por los residuos Ser-Asp/Glu-His (Bornscheuer, 2002).

En años recientes se ha incrementado el uso de enzimas en diversas aplicaciones industriales (Jisha *et al.*, 2013), las cuales usualmente requieren de características particulares, tales como: especificidad de sustrato, alta velocidad de reacción en un rango de temperatura, pH y estabilidad, etc. Las estererasas tienen características que las hacen muy atractivas para aplicaciones industriales, tales como estabilidad en solventes orgánicos, alta quimio y regio selectividad y porque no requieren de la adición de cofactores (Martínez-Martínez *et al.*, 2013; Bornscheuer, 2002).

Actualmente, las estererasas se emplean en amplio rango de aplicaciones, principalmente en la producción de componentes enantiopuros en la síntesis química (Bornscheuer and Kazlauskas, 1999), en la industria farmacéutica, como aditivos en detergentes, en la producción de cosméticos, alimentos y en la fabricación de textiles (Cheng *et al.*, 2014; Xin y Ying, 2013).

Estas industrias demandan nuevas estererasas con características específicas. Por lo cual se ha incrementado la búsqueda de estererasas con nuevas propiedades. En los últimos años la búsqueda ha sido compleja utilizando métodos tradicionales de microbiología basados en el cultivo de microorganismos. Con estos procedimientos solo se puede acceder al 1 % de bacterias presentes en una muestra ambiental (Amann *et al.*, 1995; Torsvik y Daae, 1990), lo cual ha sido muy restringido. La búsqueda de actividades funcionales en bibliotecas metagenómica ha demostrado que es una excelente opción para el descubrimiento de enzimas (De Santi *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2015), debido

a que estas tecnologías permiten la clonación y expresión de genes de bacterias no cultivables.

El estado de Yucatán, México alberga uno de los ríos subterráneos más grandes del mundo. Este Acuífero contiene comunidades microbianas particulares (Schmitter *et al.*, 2002; Gamboa-Angulo *et al.*, 2012), posiblemente debido a las condiciones tales como, falta de luz, la riqueza de carbonato de calcio y el agua oligotrófica, por lo que este ambiente es atractivo para análisis metagenómico (Rojas *et al.*, 2011) en la búsqueda de enzimas biotecnológicamente útiles.

En este trabajo, se identificó, a partir de una biblioteca metagenómica del Acuífero de Yucatán y a través del escrutinio de 27 000 fósidos, una nueva esterasa, a la cual se le denominó EstAS3B. Esta esterasa fue clonada, sobreexpresada y caracterizada funcionalmente. El análisis *in silico* arrojó una identidad de 91 % con una esterasa de *Sphingobium yanoikuyae*. Su caracterización estructural a través de la bioinformática sugiere que pertenece a una nueva familia de esterases o a una subfamilia de esterases de la familia IV.

ANTECEDENTES

Las enzimas son los catalizadores de las reacciones en los sistemas biológicos, cuyas características principales son la alta especificidad y velocidad de reacción.

Las funciones fisiológicas de las lipasas y esteraras no se conocen totalmente; se sabe que su expresión depende de una compleja regulación, más allá de la hidrólisis de grasas y participan en el suministro de fuentes de carbono a la célula (Beisson *et al.*, 2000). Además, se sabe que muchas bacterias producen lipasas que actúan como factores de virulencia (Degrassi *et al.*, 2008; Devescovi *et al.*, 2007; Heurlier *et al.*, 2004).

1.1.1 Esterasas y lipasas

Las enzimas lipolíticas –lipasas y esteraras- catalizan la hidrólisis de enlaces éster mediante la adición de agua entre los ácidos grasos y el glicerol u otro residuo alcohólico. Las enzimas lipolíticas comprenden dos grupos que se diferencian por la longitud de los ácidos grasos sobre los que actúan; las lipasas "verdaderas" actúan sobre acilgliceroles de cadena larga (≥ 10 átomos de carbono), los cuales son poco solubles en agua. La mayoría de las lipasas actúan sobre sus sustratos en la interfase lípido-agua. Por su parte las esteraras actúan preferentemente sobre acilgliceroles de cadena corta (≤ 10 átomos de carbono) (Gilham y Lehner, 2005). En disolventes orgánicos, o cuando sólo una pequeña cantidad de agua está presente, estas enzimas son capaces de catalizar la reacción de esterificación o la transesterificación, donde el residuo de un éster carbonilo se intercambia con otro grupo carbonilo de un alcohol. Las reacciones de síntesis pueden ser de distintos tipos: esterificación (síntesis de un éster partir de un ácido carboxílico y un alcohol), transesterificación (intercambio de grupos entre un éster y un alcohol, reacción de nominada alcoholólisis, un éster y un ácido, acidólisis, o dos esterases, interesterificación) (Fig.

1.1).

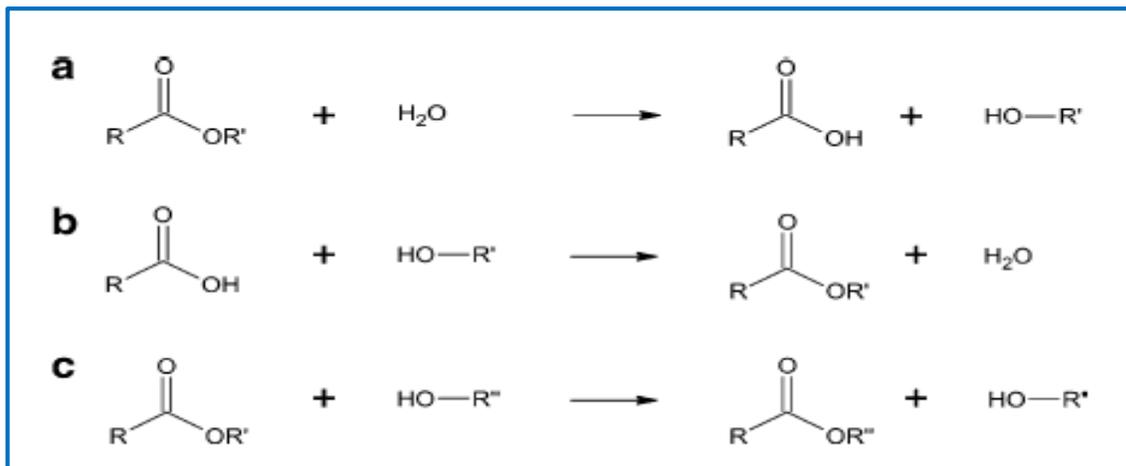


Figura 1.1. Reacciones catalizadas por esterasas: a) Hidrólisis, b) Esterificación y c) Transesterificación (Levisson et al., 2009).

1.1.2 Estructura y mecanismo de acción

El mecanismo de acción de las lipasas es el mismo para las esterasas, el cual consiste en la hidrólisis de un enlace éster entre un ácido carboxílico y un grupo alcohol en agua (Holmquist, 2000). Así mismo el mecanismo catalítico se basa en un sistema de intercambio de cargas que consta de cuatro etapas.

1) Tras la unión del sustrato a la enzima, se produce el ataque nucleofílico. Este ataque es llevado a cabo por parte del grupo hidroxilo de la serina catalítica de la enzima sobre el enlace éster del sustrato, lo que lleva a la ruptura del enlace éster y a la formación de un intermediario tetraedro entre el ácido graso y la serina nucleofílica, el cual es estabilizado por la presencia de dos glicinas cercanas al centro activo formando el agujero oxianión; el residuo nucleofílico serina está localizado en el extremo carboxilo terminal de la cadena β -5 en un pentapéptido altamente conservado, Gly-X-Ser-X-Gly, donde X puede ser cualquier aminoácido, formando una estructura β -giro- α llamada bolsillo nucleofílico. 2) Este tetraedro es rápidamente descompuesto, con la ayuda de una histidina protonada, lo cual provoca la liberación del alcohol del enlace éster y la formación del complejo acil-enzima. 3) Posteriormente, el complejo acil-enzima es atacado por una molécula de agua, con la ayuda de la histidina, formándose un segundo intermediario tetraedro y 4) Finalmente se produce la liberación del ácido graso y la regeneración del centro catalítico.

Las esterasas y lipasas comparten una estructura α/β hidrolasa; esta conformación estructural está altamente conservada entre estas enzimas hidrolíticas. Dicha estructura está compuesta por 8 hojas β y por 6 α -hélices y generalmente contienen una triada catalítica constituida por Ser-Asp/Glu-His (Fig.1.2).

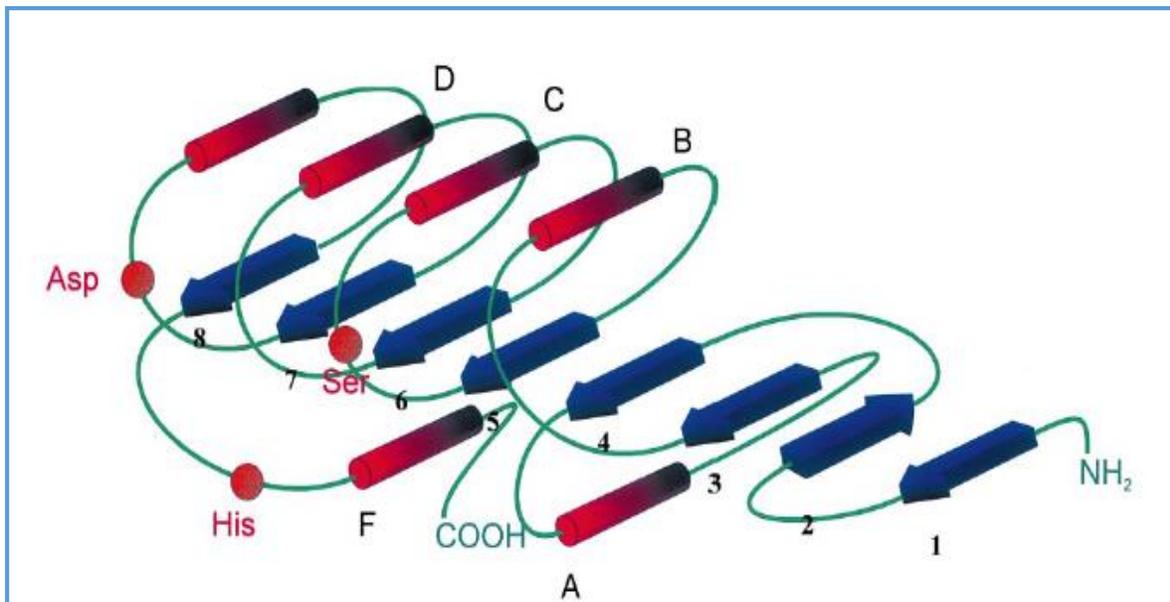


Figura 1.2. Plegamiento α/β hidrolasa de lipasas y esterasas. Hojas β mostradas en flechas en azul (1-8), α hélices mostradas en rojo (A-F). Las posiciones relativas de la triada catalítica se indican en círculos rojos (Figura basada en Jochens *et al.*, (2011) y Bornscheuer (2002).

1.1.3 Diferencias entre lipasas y esterasas

Las lipasas se pueden distinguir de las esterasas por el fenómeno de activación interfacial, el cual sólo ha sido observado en las lipasas. Las esterasas obedecen a la cinética clásica de Michaelis Menten, mientras las lipasas requieren concentraciones pequeñas de sustrato para activarse e incrementar su actividad. La activación interfacial se debe a un dominio hidrófobo (tapa) que cubre el sitio activo de las lipasas. En presencia de una mínima concentración de sustrato, por ejemplo una fase de triglicéridos o un disolvente orgánico hidrófobo, la tapa se mueve haciendo el sitio activo más accesible (Jochens *et al.*, 2011).

Las lipasas “prefieren” sustratos insolubles en agua, generalmente triglicéridos con ácidos grasos de cadena larga, mientras que las esterases preferentemente hidrolizan ésteres simples (por ejemplo, acetato de etilo) y ácidos grasos de cadena corta (Bornscheuer, 2002). Es decir una diferencia sustancial es que las esterases pueden actuar sobre ésteres no lipídicos ó ésteres de lípidos de cadena corta (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1. Diferencias entre lipasas y esterases basado en sus propiedades catalíticas (Kapoor y Gupta 2012; Bornscheuer 2002).

Propiedad	Lipasa	Esterasa
Sustrato preferido	Triglicéridos(con ácidos grasos de cadena larga), alcoholes secundarios	Ésteres simples, triglicéridos (con ácidos grasos de cadena corta)
Activación interfacial (tapa)	Si	No
Grado de hidrofobicidad del sustrato	Alto	Alto a bajo
Enantioselectividad	Generalmente alto	Alto a bajo
Estabilidad en solventes	Alto	Alto a bajo

1.2 Aplicaciones biotecnológicas

Más allá de su relevancia desde el punto de vista biológico, las lipasas y esterases han atraído mucha atención debido a su amplia aplicación en procesos biotecnológicos (Pereira *et al.*, 2015; López *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2014; Fillat *et al.*, 2014; Selvin *et al.*, 2012).

Muchas lipasas y esterases presentan regio y estereoselectividad, lo que las hace herramientas valiosas como catalizadores para procesos de síntesis orgánica. Además, algunas son estables en disolventes orgánicos, lo que facilita la disolución de los sustratos y la recuperación de los productos de la reacción. No requieren de cofactores para su actividad, y en muchos casos pueden obtenerse en grandes cantidades por procedimientos accesibles, pudiendo incluso en algunas aplicaciones utilizarse los extractos crudos o preparaciones enzimáticas con niveles bajos de purificación. Estos dos factores disminuyen los costos de las reacciones catalizadas por lipasas y esterases, haciéndolas

económicamente viables (Bornscheuer, 2002).

Tanto las lipasas como las esterasas pueden ser agregadas a detergentes, como surfactantes para eliminar manchas de aceite. Esto es posible debido a que estas enzimas son extraordinariamente estables frente a los detergentes. Como se ha mencionado, la amplia mayoría de carboxilesterasas y lipasas actúan de forma independiente de un cofactor, lo que hace su aplicación industrial más fácil y rentable (Godinho *et al.*, 2011).

Ampliando sobre las esterasas, las cuales son el interés de este trabajo, estas enzimas se han aislado principalmente a partir de *Streptomyces* sp. (Nishimura y Inouye 2000), *Pseudomonas* sp. (Kim *et al.*, 2002), *Bacillus* sp. (Kim *et al.*, 2004), *Lactobacillus* sp. (Choi y Lee, 2001), *Thermoanaerobacterium* sp. (Shao y Wiegel 1995) y *Micrococcus* sp. (Fernández *et al.*, 2004).

Hoy en día con la biotecnología industrial, las esterasas microbianas se utilizan en una gran cantidad de campos industriales, por ejemplo en la síntesis de fármacos como el ibuprofeno, acetaminofén, etc., y cosméticos o en la fabricación de textiles y alimentos (Deiman *et al.*, 2008; Kirk *et al.*, 2002). Las esterasas también se utilizan para la producción de ésteres saborizantes y sustancias olorosas para perfumes (Divakar y Manohar, 2007), y son capaces de procesar productos de desecho hidrofóbicos (ceras, triglicéridos) que se acumulan durante la producción de textiles y papel, esterificando el polivinil alcohol con acético y convirtiéndolo en acetato de polivinilo (Jegannathan y Nielsen, 2013; Skals *et al.*, 2008; Patrick, 2004; Jaeger y Reetz 1998,). Durante la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales y metanol las enzimas lipolíticas realizan reacciones de esterificación y transesterificación que dan lugar a los ésteres metílicos deseados. En síntesis, las esterasas no solo degradan ácidos grasos, también sintetizan sustratos ésteres que no son de naturaleza lipídica (López *et al.*, 2014; Fan *et al.* 2012; Robles-Medina *et al.* 2009). Cabe recalcar que a diferencia de las lipasas, la falta de necesidad de un ambiente lipídico para actuar hace más fáciles de utilizar las esterasas en medios acuosos, resultando más fácil y económico. Es decir, para reacciones que pueden ser mediadas por lipasas o esterasas, estas últimas ofrecen ventajas de facilidad de manejo.

1.3 Propiedades fisicoquímicas de interés industrial de esterasas

Las esterasas son enzimas robustas, capaces de soportar condiciones duras de bioconversiones industriales; amplio rango de pH, presencia de solventes orgánicos y estabilidad a altas temperaturas, versatilidad catalítica y especificidad de sustrato.

Muchas de las esterasas son de origen microbiano y se han aislado de una gran variedad de fuentes; los extremófilos en particular son adaptados a condiciones de vida en la que existen, condiciones fisicoquímicas extremas como altas temperaturas (termófilos), frío (psicrófilos), valores de pH bajos (acidófilos), o altos (alcalófilos), altas concentraciones de sales (halófilos), altas presiones (barófilos) (López *et al.*, 2014). Estos microorganismos se encuentran adaptados a su ambiente, por lo tanto, sus enzimas muchas veces están diseñadas para funcionar en las condiciones en las que habitan esos organismos (Fig. 1.3).

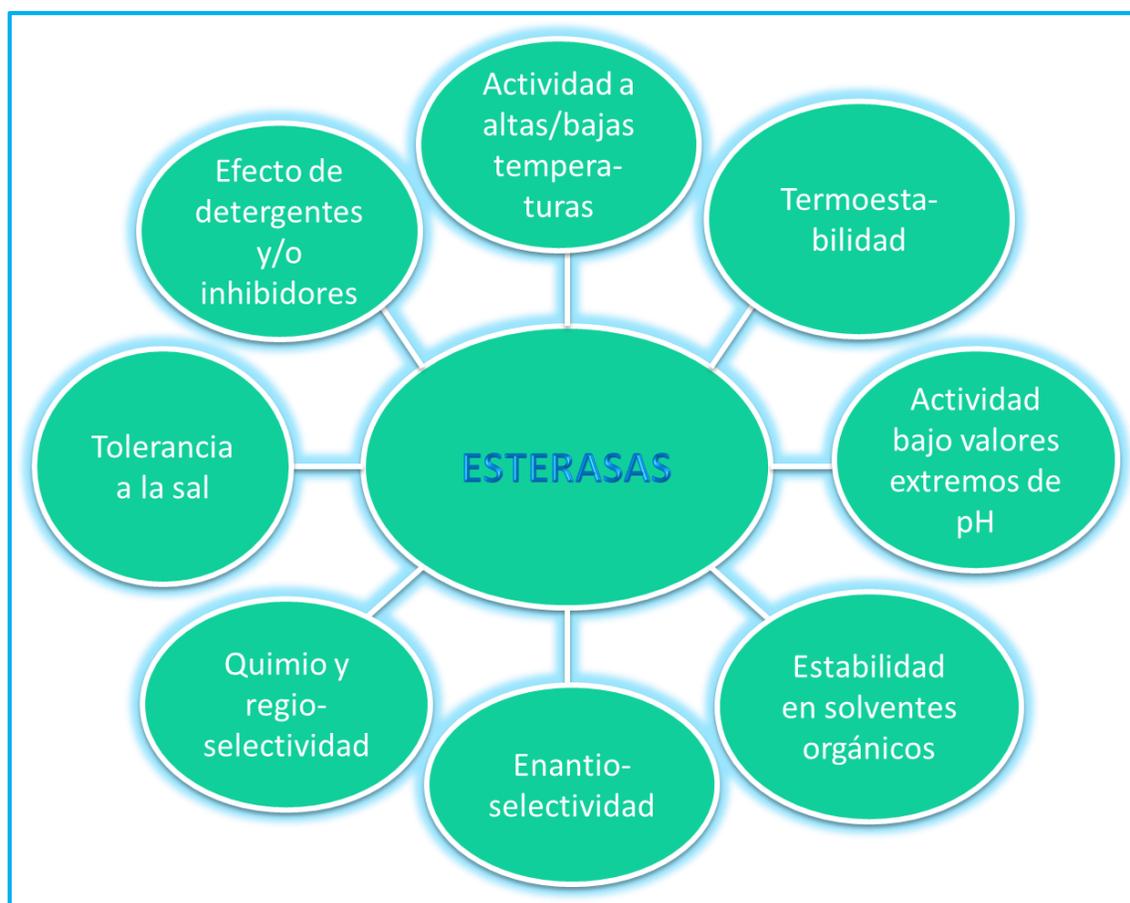


Figura 1.3. Propiedades valiosas de las esterasas que determinan su potencial como

biocatalizadores industriales. Modificado de López *et al.*, 2014.

El uso de enzimas como biocatalizadores para reemplazar los productos químicos o para crear métodos alternativos es muy importante en el área de la biotecnología blanca. En décadas pasadas se ha incrementado el uso de nuevas tecnologías para el descubrimiento de nuevos biocatalizadores. En contraste a los clásicos escrutinios basados en cultivo de microorganismos o cultivos enriquecidos, las técnicas modernas utilizan el enfoque metagenómico (Barone *et al.*, 2014; Uchiyama *et al.*, 2009).

1.4 Metagenómica

En las últimas dos décadas, una de las estrategias ampliamente adoptadas para estudiar la diversidad microbiana ha sido el uso de la metagenómica. El metagenoma se define como el total de la composición genética de las comunidades microbianas de un medio ambiente. Su estudio se basa en el aislamiento del ADN total de una muestra ambiental y la amplificación y secuenciación masiva de genes, como los 16S ribosomales; en el caso de construir bibliotecas metagenómicas, los fragmentos de ADNs metagenómicos se clonan en vectores de ADN (Handelsman, 2004).

La metagenómica es una tecnología reciente y poderosa, que surgió como reacción a la observación de que la mayoría de los microorganismos son imposibles de cultivar en el laboratorio. Se estima que un 99% de la vida microbiana no es cultivable (Handelsman, 2004). Los pasos básicos de la construcción de la biblioteca de ADN (generación de fragmentos de ADN de tamaño adecuado, la clonación de fragmentos en un vector y tamizado para la identificación del gen de interés se muestran en la figura 1.4 (Sabree *et al.*, 2009).

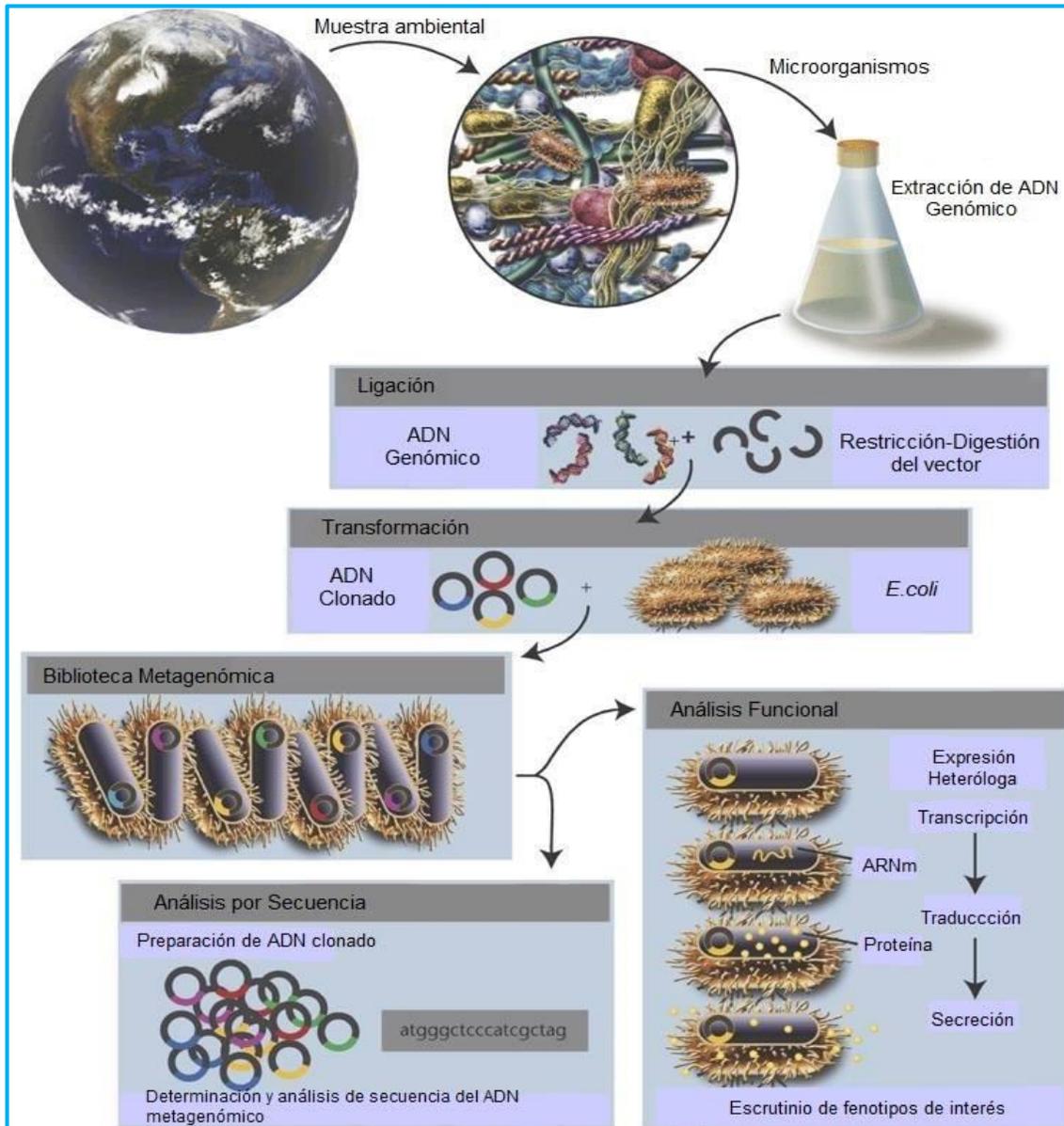


Figura 1.4. Construcción y análisis de bibliotecas metagenómicas para el descubrimiento de enzimas (modificada de Handelsman *et al.*, 2007).

Hasta la fecha, las enzimas industrialmente más relevantes son de origen microbiano. Por lo tanto, el descubrimiento de enzimas microbianas es un paso clave en el desarrollo de bioprocesos industriales, y la metagenómica es un enfoque alternativo a los análisis microbiológicos convencionales. Se prevé que esta tecnología permita acelerar el proceso

de descubrimiento de nuevos genes microbianos útiles. De hecho, al momento se han identificado diversas enzimas con actividades y / o secuencias únicas (Steele *et al.*, 2009, Ferrer *et al.*, 2009).

Estudios recientes sobre escrutinios funcionales de metagenomas muestran el éxito obtenido en la identificación de enzimas de interés, como se puede observar en el cuadro 1. 2.

Cuadro 1.2. Identificación y aislamiento de enzimas durante el periodo 2007 a 2009 a partir de metagenomas (modificado de Uchiyama *et al.*, 2009).

Ambiente	Gen diana	Huésped y vector usado	Tamaño del inserto(k b)	Clones positivos	Técnica de ensayo
Composta	Esterasa Amilasa Fosfatasa Proteasa	<i>E.coli</i> , plásmido	3.2	14/21 000 13/ 31 967 38/31 967 0/31 967	Ensayo en placas de agar
Suelo	Xilanasas	<i>E.coli</i> , plásmido	8.5	1/24 000	Ensayo en placas de agar
Suelo franco	Oxigenasa	<i>E.coli</i> , plásmido	5.5	1/65 000	Ensayo en placas de agar
Hielo glaciar	ADN polimerasa I	<i>E.coli</i> , plásmido	4	230/230 000	Ensayo de crecimiento
Sedimento marino	Lipasa	<i>E.coli</i> , fósido	32	1/8 823	Ensayo en placas de agar
Agua marina superficial	Esterasa	<i>E.coli</i> , BAC	70	4/20 000	Ensayo en placas de agar
Heces de cerdos	Gen de resistencia a tetraciclina	<i>E.coli</i> , BAC	15	10/9 000	Ensayo de crecimiento
Suelo con aceite	Naftaleno deoxigenasa	<i>Pseudomonas putida</i> , cósmido	25	2/24 000	Ensayo de crecimiento

1.5 Antecedentes de la biblioteca metagenómica del Acuífero de Yucatán

En el año 2012 en el grupo de la Dra. Aileen O´connor (Unidad de Biotecnología, CICY) se construyó una biblioteca metagenómica proveniente del Acuífero de Yucatán. El ADN metagenómico se clonó en el fósido pCC2FOS™ transformando la cepa *E. coli* EPI300™ (Epicentre).

En la Península de Yucatán existen ecosistemas acuáticos con una diversidad microbiológica muy particular. Estos ambientes son fundamentales en el equilibrio ecológico, y están fuertemente amenazados debido a las actividades humanas. El acceso y conocimiento de los recursos microbianos de estos sitios, además de tener un enorme atractivo científico, tiene el potencial de traducirse en productos biotecnológicos que generen procesos más eficientes y ambientalmente amigables. La singular composición y conformación del subsuelo, la rica diversidad biológica de la región, la falta de estudio de esta biodiversidad (del Acuífero, en particular), y la naturaleza altamente aislada de algunas de sus áreas, hacen de éste un ambiente de gran interés para los análisis de metagenómica (Rojas *et al.*, 2011).

1.6 Identificación de clones con actividad de esterasas

Con la finalidad de seleccionar un clon con actividad lipolítica se emplearon dos sustratos; el gliceril tributirato o tributirina, el cual está formado por tres ácidos butíricos (C4) unidos mediante enlaces éster al glicerol y el gliceril trioleato o la trioleína, el cual está formado por tres ácidos oleicos (C18) unidos por enlaces éster al glicerol. El primer sustrato permite detectar clones con actividad de esterasa, el segundo sustrato permite distinguir cuales tienen actividad de lipasa.

En el escrutinio funcional se analizaron un total de 27,000 clones de la biblioteca metagenómica del Acuífero de Yucatán sobre medio LB con tributirina al 1% como medio selectivo, incubando toda la noche a 37°C. Después de la incubación se mantuvieron a temperatura ambiente (25°C) para realizar las observaciones y encontrar las clones con halos claros alrededor, que corresponden a la actividad lipolítica (Fig. 1.5).

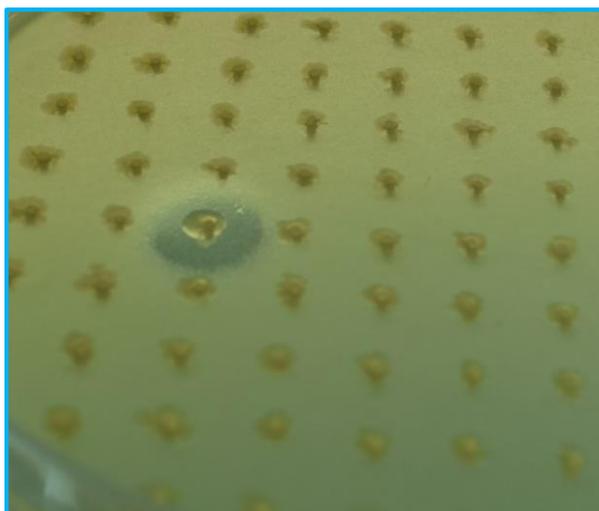


Figura 1.5. Escrutinio funcional de la biblioteca metagenómica del Acuífero de Yucatán sobre medio LB sólido con tributirina. Una colonia muestra el halo claro, indicativo de la actividad de esterasa. Fotografía tomada por Sergio Ramos Jiménez (datos no publicados).

Como control negativo se empleó la cepa *E. coli* EPI300™ desprovista del fósido. Previamente el CICY en 2013, Muñoz-López identificó 12 clonas con actividad de esterasa mediante un análisis funcional, el cual se basó en la identificación de fenotipos que mostraron halos de degradación en medios de cultivo con tributirina (datos no mostrados).

Por otro lado, se realizó un ensayo de actividad en medio LB con aceite de olivo y Rodhamina B y no se detectó actividad, lo que sugiere que no poseen actividad de lipasas.

A partir de las 12 clonas que presentaron actividad lipolítica se purificaron los fósidos con el Kit “Fosmid Max TM DNA purification”, con el fin de analizar mediante patrones de restricción el tamaño del inserto clonado, así como el patrón de restricción para descartar las clonas que fueran iguales, con base en coincidencia de los perfiles de restricción. Se concluyó que todas las clonas fueron diferentes y se enviaron a la Universidad de Utah, Estados Unidos para su secuenciación. La clona 3 fue secuenciada sola y las clonas 1,2, 4-12 se secuenciaron el pool. Se usó la plataforma Ion Torrent (Lifes Technologies). Para los pools los fósidos fueron digeridos y cada fragmento etiquetado; las etiquetas para cada fósido fueron diferentes, con el fin de que fuera posible distinguir a que clona

pertenecen y poder ensamblar las secuencias de cada uno.

Se pudieron ensamblar 5 insertos cuyos tamaños no coinciden con los tamaños estimados por digestión; lo que indica que para una valoración exacta del tamaño de los insertos, el análisis de restricción no es adecuado por la sobreestimación del tamaño de las bandas obtenidas. Otra posibilidad en la variación del tamaño podría deberse al tipo de secuenciación empleada (Ion torrent) en la cual se generan fragmentos muy cortos de ADN y son más difíciles de ensamblar (50-100 pb). El 50% de los insertos no pudieron ser ensamblados *in silico*.

Posteriormente, se llevó a cabo el análisis *in silico* de los insertos de la clona 3 y los provenientes del pool (agrupamiento) de 11 clonas usando el programa Geneious Pro trail 5.4.7. Se realizó predicción de los marcos de lectura abiertos (ORF's) de cada contig para realizar un análisis BlastX en el NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Este era el estado del arte en el momento de iniciar esta tesis. A partir de estos antecedentes se planteó el siguiente trabajo.

OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar un gen con actividad de esterasa proveniente de una biblioteca metagenómica del Acuífero de Yucatán.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar un gen con actividad de esterasa extracelular
- Subclonar en un vector de expresión pLATE31 la región codificante de un gen de esterasa
- Sobreexpresar el gen de esterasa en el sistema de expresión aLICator
- Determinar la especificidad de sustrato
- Determinar el pH óptimo de la enzima
- Determinar la temperatura optima de la enzima
- Caracterizar *in silico* la enzima

JUSTIFICACIÓN

Las esterasas son biocatalizadores diversos en sus propiedades enzimáticas y muestran amplia especificidad por el sustrato, lo que las hace muy atractivas en la industria papelera, farmacéutica, de detergentes, etc. En las últimas décadas, la metagenómica se ha convertido en una tecnología poderosa que ha permitido acceder a la diversidad genética de los microorganismos, directamente de su ambiente, por lo que el escrutinio funcional podría permitir identificar enzimas con potencial biotecnológico.

Así mismo las enzimas lipolíticas están recibiendo mucha atención, debido a que algunos de los productos industrialmente importantes fabricados mediante procesos químicos pueden ser generados por las esterasas con mayor rapidez y especificidad (Shah *et al.*, 2007; Salis *et al.*, 2005;) por lo tanto, su potencial biotecnológico es alto, ya que pueden ser utilizadas en la industria agroalimentaria, biocombustibles, farmacéutica, procesamiento de aceites, industria cosmética, etc. Estas áreas requieren de procesos enzimáticos para la modificación y/o eliminación de moléculas. Desde esta perspectiva, las esterasas constituyen un grupo de enzimas importantes para la modificación y generación de nuevos productos para el mercado creciente en el mundo actual (Leis *et al.*, 2014; López *et al.*, 2014).

Las esterasas han sido aisladas de diversas fuentes, en las cuales se incluyen un gran número de bacterias, hongos, plantas y animales (Dutta y Ray, 2009). Esta diversidad de fuentes de origen les confieren una amplia gama de propiedades con respecto a la especificidad posicional (posición del éster que atacan en un triglicérido), la especificidad de ácidos grasos, termoestabilidad, pH óptimo, etc. (Akoh, 2004; Jaeger *et al.*, 2002).

Las enzimas microbianas son, a menudo, más útiles que las derivadas de plantas o animales debido a la gran variedad de actividades que catalizan, la posibilidad de producir grandes cantidades utilizando manipulación genética, así como el rápido crecimiento de microorganismos en los medios de cultivo, bajo costo, a sus altos rendimientos y facilidad de manipulación genética (Gurung *et al.*, 2013). Además, las enzimas microbianas son más estables que las enzimas extraídas de vegetales y animales, y su producción es más conveniente y más segura (Anbu *et al.*, 2015; Adrio y Demain, 2014).

La gran mayoría de las lipasas y esterases aisladas para aplicaciones industriales se obtuvieron a través del estudio de cultivos de cepas puras de microorganismos (Ogawa y Shimizu, 2002). Sin embargo, por este método es cada vez más difícil obtener lipasas verdaderamente diferentes, ya que los métodos de cultivo permiten acceder solamente alrededor de 1% de la diversidad microbiana existente, ya que su crecimiento requiere condiciones desconocidas (Lorenz *et al.*, 2005).

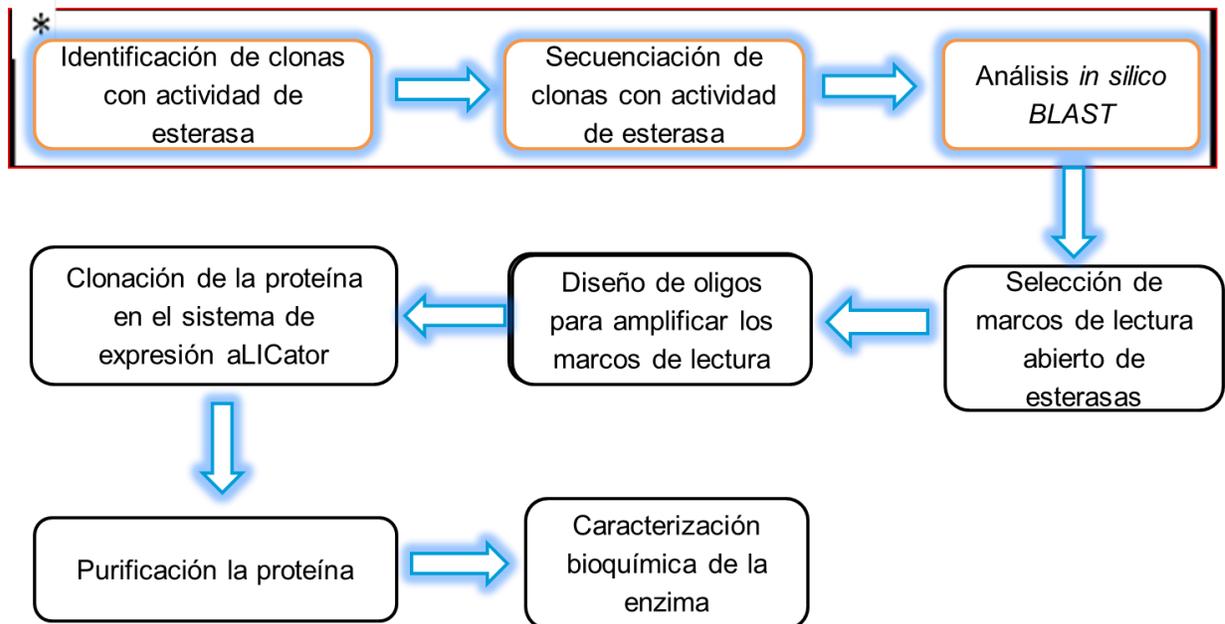
Muchos de los microorganismos aún no cultivables pueden adaptarse a una amplia gama de parámetros físico-químicos que coinciden con los requisitos industriales (pH, presión y temperatura), por lo que los genes de una determinada microbiota representan una fuente potencial de funciones biológicas desconocidas. La elucidación de estos genes puede aumentar la oportunidad de diseñar nuevos procesos biotecnológicos (Nacke *et al.*, 2011).

La gran mayoría de los microorganismos que se analizan en una muestra ambiental no son cultivables, por lo tanto, se necesitan emplear nuevas metodologías que nos permitan acceder a todo el material genómico desconocido. El conocimiento de las poblaciones microbianas en aguas, suelos y otros ambientes específicos se halla en etapas tempranas, por lo que es imperativo actualmente el estudio de los metagenomas.

La metagenómica funcional es una estrategia que involucra herramientas de biología molecular, como el aislamiento directo del ADN de un ambiente determinado, seguido por la clonación del metagenoma completo en un vector apropiado, la secuenciación directa de este ADN ambiental o, la amplificación de secuencias de interés para análisis de función (Sleator *et al.*, 2008).

En la Península de Yucatán existen ecosistemas acuáticos con una diversidad microbiológica que se espera sea particular. Estos ambientes son fundamentales en el equilibrio ecológico de la zona, y están fuertemente amenazados debido a las actividades humanas. El acceso y conocimiento de los recursos microbianos de estos sitios, además de tener un enorme atractivo científico, tiene el potencial de traducirse en productos biotecnológicos que generen procesos más eficientes y amigables con el medio ambiente. Estos productos se pueden poner a disposición de la industria no sólo local sino mundial, todo un arsenal de microorganismos y/o moléculas novedosas acordes con las necesidades

actuales. En años recientes, con la aparición de la tecnología metagenómica, el conocimiento de la diversidad microbiana en comunidades complejas ha empezado a experimentar un desarrollo vertiginoso (Rojas *et al.*, 2011). Se plantea la posibilidad de obtener una enzima con características diferentes a las existentes, dadas las condiciones del sitio antes mencionado.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

*Actividades realizadas previamente por Muñoz-López

CAPITULO II: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN GEN DE ESTERASA.

2.1 INTRODUCCION

La subclonación es un procedimiento básico en la biología molecular, requerida para mover un inserto de un vector a otro, para poder realizar estudios posteriores de funcionalidad del inserto (Fromme *et al.*, 2007).

Tradicionalmente los métodos de clonación se han basado en la amplificación por PCR del fragmento de interés, utilizando cebadores para facilitar la clonación; los sitios de restricción únicos en las regiones cebadoras flanqueantes se digieren y el producto de PCR se liga en un vector que contiene extremos cohesivos compatibles. Otra técnica de clonación es la técnica "TA", en la cual se añade un único residuo de adenina en cada extremo del producto de PCR mediante la *Taq* polimerasa, lo cual facilita la ligación en un vector que lleva un residuo de timina saliente, complementaria al residuo antes mencionado (Holton y Graham, 1991).

Otra alternativa a los métodos anteriores es la clonación independiente de ligación, en la cual se diseñan cebadores que flaquean al gen de interés y se le agregan adaptadores (secuencias de ADN complementarias al vector). De esta manera, el producto amplificado puede ser recombinado con el vector debido a que contiene extremos complementarios del mismo (Holmberg *et al.*, 2014).

Por otro lado, la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* permite producir grandes cantidades de proteína. Sin embargo, no siempre se obtiene altos rendimientos de enzima soluble y pura a partir de un cultivo celular. Esto se debe a que algunas enzimas tienen el potencial de interferir con el metabolismo y la membrana celular del huésped, especialmente *E. coli*, reprimiendo la alta producción de enzimas o almacenándola de forma inactiva en cuerpos de inclusión (Długolecka *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 1991). Con la finalidad de evitar un mal plegamiento, se han utilizado huéspedes fúngicos como *Pichia pastoris* (Ahmad *et al.*, 2014), *Saccharomyces cerevisiae* (López-López *et al.*, 2010), las especies de *Kluyveromyces* (Rocha *et al.* 2011) y *Candida rugosa* (Ferrer *et al.*, 2001); los huéspedes mencionados anteriormente han sido utilizados como cepas de expresión. Sin embargo, *E. coli* sigue siendo el huésped de expresión utilizado con mayor frecuencia

para las lipasas y esterases bacterianas, debido a su fácil manejo de cultivo y su bajo costo, además porque actualmente están disponibles muchas cepas diferentes y sistemas de expresión en *E. coli*.

El empleo de una etiqueta de histidina en una proteína permite obtener un alto nivel de pureza ya que la proteína puede ser purificada en sencillos pasos por medio de cromatografía de afinidad. Actualmente los procedimientos de purificación evitan pérdidas debido a la facilidad de purificación. Y la adición de una etiqueta de afinidad permite la fácil detección de la proteína recombinante. Se ha demostrado que dicha etiqueta no interfiere con la estructura, función y secreción de la proteína (Eschenfeldt *et al.*, 2011; QIAexpress® Ni-NTA Fast Start Handbook, 2011; Ramchuran *et al.*, 2006).

Se realizó una extensa revisión bibliográfica en cuantos a las características funcionales que se han utilizado en diferentes trabajos de clonación de lipasas y esterases en vectores de expresión. El resumen se presenta en el cuadro 2.1.

Cuadro 2.1 Vectores y características de los genes clonados.

Nombre del artículo	Vectores empleado	Características del gen clonado	Referencia
Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach	Sub-bibliotecas en pUC18 Vector de expresión pET-28a(+) vector (Novagen) N-terminal (His)6 tagged	No se identificó péptido señal ni dominios de transmembrana. El gen fue predicho como una proteína soluble.	Glogauer <i>et al.</i> , 2011.
Gene cloning and characterization of a novel esterase from activated sludge metagenome	pET 28a(+) His-tag en N-terminal	-----	Zhang <i>et al.</i> , 2009
Identification and characterization of novel esterases from a deep-sea sediment metagenome	pUC19 vector (Novagen) Vector de expresión pET-28b(+)	-----	Jiang <i>et al.</i> , 2011
A novel esterase		No se encontró sitio de corte	Peng <i>et al.</i> , 2011

gene cloned from a metagenomic library from neritic sediments of the South China Sea	pUC18 pET28a(+)	ni péptido señal con signal P lo que sugiere que es una proteína soluble.	
A novel family VII esterase with industrial potential from compost metagenomic library	pET-22b(+) (QIAGEN)	Se identificó un péptido señal en el amino terminal	Kang <i>et al.</i> , 2011.
Expression and purification of organic solvent stable lipase from soil metagenomic library	QIAexpress Cloning Kit from QIAGEN	La secuencia tenía una señal de secreción en C-terminal con un posible motivo de unión Ca ⁺ , dependiente del transportador ABC.	Khan y Jithesh., 2012.
Isolation and functional expression of a novel lipase gene isolated directly from oil-contaminated soil	Expresión en pET-32a con una etiqueta de histidina en el extremo N terminal	No se identificó péptido señal	Zuo <i>et al.</i> , 2010.
Identification of novel lipolytic genes and gene families by screening of metagenomic libraries derived from soil samples of the German Biodiversity Exploratories	Etiqueta de histidina en el extremo N terminal	Las secuencias de aminoácidos analizadas en Signal P muestran las tres distintas partes; N, H y C, lo que sugiere que estas enzimas son secretadas y su función es extracelular.	Nacke <i>et al.</i> , 2011.
Isolation of a novel alkaline-stable lipase from a metagenomic library and its specific application for	Vector pET28 con una etiqueta de histidina en el extremo C-terminal. La secuencia se amplificó sin el péptido es decir partir del aminoácido 27	El análisis Signal P reveló presencia de un péptido señal.	Peng <i>et al.</i> , 2014.

milkfat flavor production			
Isolation and characterization of a heavy metal-resistant, thermophilic esterase from a Red Sea Brine Pool	vector pET-SUMO His-tagged N-terminal	La proteína fue predicha como una proteína soluble; no se detectó péptido señal. Se identificó un dominio de transmembrana usando el programa TMAP.	Mohamed <i>et al.</i> , 2013.
The Metagenome-Derived Enzymes LipS and LipT Increase the Diversity of Known Lipases	pET21a His ₆ -tag en el C-terminal	Se encontró un péptido señal en el N terminal	Chow <i>et al.</i> , 2012.

N, H, C, amino terminal, región hidrófoba y carboxilo terminal, respectivamente.

Como se puede observar en el cuadro 2.1, en diversos trabajos se han empleado vectores de expresión que en general tienen la etiqueta de histidina en el extremo contrario donde se encuentra localizado el péptido señal. También se han reportado trabajos de clonación de genes de esterases y lipasas, donde estos no se identifican los péptido señal y se han logrado clonar con éxito y visto la actividad en placa, lo que sugiere que esos genes codifican para proteínas extracelulares, aunque no poseen un péptido señal canónico de secreción.

Entre los vectores más usados están los de la serie pET, los cuales se derivan del plásmido pBR322, contienen un promotor del gen bacteriófago T7, el cual promueve un alto nivel de transcripción y traducción. La ARN polimerasa del bacteriófago T7 es altamente específica para la secuencia del promotor T7 y el promotor no es reconocido por la ARN polimerasa de la célula huésped. De esta manera el gen introducido se encuentra transcripcionalmente apagado en estado no inducido; después de la inducción, ocurre un alto nivel de expresión del gen de interés, el cual se transcribe y se traduce abundantemente, mayormente se emplea la inducción positiva, adicionando IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) o lactosa al medio de cultivo bacteriano (pET System Manual, 2011).

El sistema de expresión y clonación aLICator (Clonación Independiente de Ligación) fue

diseñado para una rápida y eficiente clonación sin necesidad de emplear enzimas de restricción y regulando la expresión del gen en *E. coli*. Los vectores de expresión bacterianos pLATE fueron diseñados para obtener altos niveles de expresión de la proteína de interés bajo condiciones de inducción, pero en ausencia del inductor hay expresión mínima basal, lo que permite la expresión de proteínas que son tóxicas para las células *E. coli* (aLICator LIC Cloning and Expression, 2012).

Una de las proteínas deducidas *in silico* en este trabajo (EstAS3B) presenta el péptido señal en el extremo amino terminal por lo que se eligió un vector que contiene la etiqueta de histidina en el extremo carboxilo terminal, para evitar que la etiqueta se perdiera en el procesamiento natural de la enzima expresada, pues se espera que el péptido señal se digiera al ser secretada.

A continuación se presenta el vector seleccionado para la sobreexpresión del gen de esterasa (Fig. 2.1).

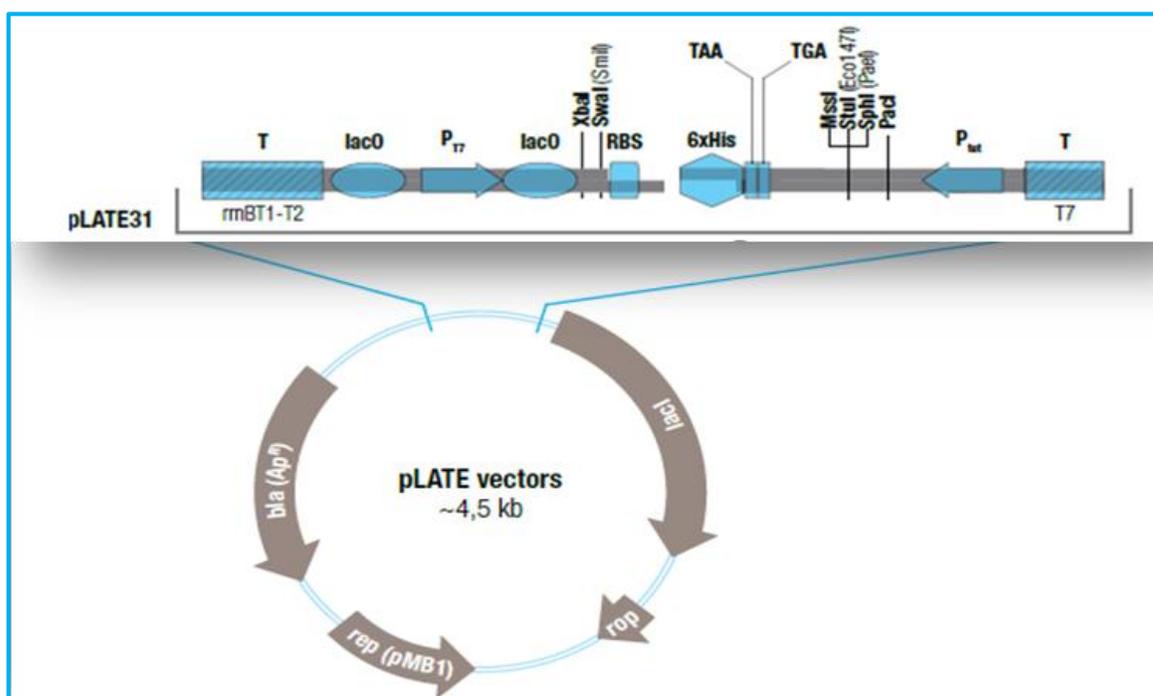


Figura 2.1. Vector de expresión elegido para la sobreexpresión del gen de esterasa en el presente trabajo.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Diseño de cebadores

El diseño de cebadores se realizó de acuerdo a las recomendaciones del Manual aLICator LIC Cloning and Expression Kit 2 (N-terminal His-tag/WQ), #K1251 (Thermo Scientific). Este manual indica que el extremo 5' del cebador debe incluir secuencias específicas del vector y en el extremo 3' sobrelapar con el gen de interés. Se recomienda que la temperatura de fusión de la sección de los cebadores complementarios al gen de interés sea de 60 ° o más.

Se eligieron 24 nucleótidos del gen a partir del codón de inicio del marco de lectura y 24 nucleótidos río abajo del codón de término. Cada cebador contenía una región complementaria al vector, de acuerdo a las instrucciones del Manual aLICator.

El cálculo de la temperatura de alineamiento de los cebadores, el porcentaje de C-G y formación de estructuras secundarias fueron analizados con los softwares Oligo Analyzer 3.1 y OLIGO EXPLORER ^{1,4}.

2.2.2 Estandarización de la Reacción en Cadena de la polimerasa

Cabe mencionar que a pesar de seguir las recomendaciones del Manual se tuvieron que realizar varias reacciones de PCR para estandarizar la temperatura de alineamiento, ya que en las primeras reacciones de PCR no hubo amplificación. La temperatura de alineamiento calculada era de 60 °C y después de las pruebas experimentales se encontró amplificación a 53°C.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 3 minutos de desnaturalización a 94 °C, 1 minuto de alineamiento a 53° C, 1 minuto de extensión a 72° C, durante 30 ciclos.

2.2.3 Clonación de los productos de PCR en el vector TOPO TA

Los productos de PCR fueron purificados empleando el Kit Gel extraction, 250 (QIAGEN), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los productos purificados fueron clonados en el Vector TOPO TA con la finalidad de enviar a secuenciar los fragmentos obtenidos, no se usó directamente el kit de expresión pLATE porque implicaba gasto de reacciones innecesarias ya que si algún marco de lectura no era

el mismo al identificado *in silico*, este podía descartarse, nos interesó saber que gen teníamos para luego expresarlo. La clonación se realizó usando el kit TOPO TA Cloning for sequencing (PCR 4 TOPO Vector, Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante; se transformó la cepa *E. coli* TOP 10, siguiendo las indicaciones del protocolo One Shot® TOP10 Competent Cells (Invitrogen).

Se realizaron las extracciones del ADN plasmídico de las 4 construcciones empleando el kit Miniprep, 250 (QIAGEN).

2.2.4 Secuenciación y análisis de secuencias

Se solicitó el servicio de secuenciación a la empresa MACROGEN (Corea); se enviaron los ADN plasmídicos en concentración de 100 ng/μl en un volumen de 20 μl cada uno.

Para el alineamiento de las secuencias de los amplicones clonados en el vector TOPO TA se usó el programa ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>).

2.2.5 Subclonación en el vector de expresión pLATE

Debido a que se encontró un cambio de nucleótido en una de las secuencias, lo cual pudo deberse a que no se utilizó un *taq* polimerasa de alta fidelidad, se decidió para la expresión amplificar a partir de los fósmidos y no de los ADNs subclonados en el vector TOPO-TA, empleando los cebadores descritos en 2.2.1

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 3 minutos de desnaturalización a 94 °C, 1 minuto de alineamiento a 53° C, 1 minuto de extensión a 72° C, durante 30 ciclos.

Posteriormente los productos de PCR se purificaron con el Kit Gel extraction, 250 (QIAGEN) con el fin de eliminar contaminantes de ADN o productos inespecíficos, así como cebadores y dNTPs no incorporados en la reacción.

La concentración de ADN del producto de PCR purificado fue de 65 ng/μl. La reacción de recombinación de este producto de PCR y el vector se llevó acabo de acuerdo con las indicaciones del Manual aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System Kit

2, #K1251 (Thermo scientific).

Los productos clonados en el paso anterior fueron transformados en las células *E. coli* TOP10, estas células fueron empleadas debido a sus características genotípicas, ya que no contiene el gen de la T7 ARN polimerasa lo que elimina la inestabilidad del plásmido, se empleó el método de transformación de choque térmico, de acuerdo al protocolo One Shot® TOP10 Competent Cells (Invitrogen).

2.2.6 Verificación de la clonación

Para confirmar la clonación se realizó una PCR en colonia empleando los cebadores del kit pLATE; de acuerdo al manual, debido a que en la reacción de ligación el inserto es incorporado de manera direccionada por recombinación de las regiones complementarias entre los extremos del vector y el inserto, normalmente más de 95% de los transformantes contienen el inserto en la orientación correcta, por lo que se decidió analizar únicamente 3 clonas recombinantes de cada transformación.

Cabe mencionar que las células BL21 (DE3) son usadas para la expresión de proteínas debido a que son deficientes de las proteasas Lon y OmpT, mientras que DE3 es el Lisógeno que codifica la ARN polimerasa T7. Lo cual hace útil a esta cepa para sistemas de expresión que emplean el gen de la T7 ARN polimerasa.

Adicionalmente se realizó la extracción del ADN plasmídico de cada una de las construcciones y se procedió a transformar el plásmido en las células de expresión BL21 (DE3), empleando el método de choque térmico, siguiendo las indicaciones del fabricante Cat. C252718 (New England Biolabs).

Finalmente, se realizó un análisis de restricción a cada clona, empleando las enzimas Stu I y Xba I (Invitrogen) que se encuentran como sitios únicos en el vector y que permiten liberar el inserto. Previamente se verificó mediante un patrón de restricción *in silico* que estos sitios no se encontraran en el inserto.

2.2.7 Análisis funcional en placas de LB y tributirina

Las clonas recombinantes en pLATE conteniendo el gen de esterasa EstAS2, EstAS3A, EstAS3B, y EstAS10 se plaquearon sobre medio LB (Luria Bertani) conteniendo Tributirina al 1 % por ser un sustrato comúnmente usado por la esterasas. Se empleó ampicilina como agente de selección (AmpR 50 mg/L) e IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) como inductor de expresión, a una concentración de 0.1 mM.

Se determinó la actividad de esterasa identificando la presencia de un halo claro de degradación del sustrato alrededor de la colonia.

Se empleó como control negativo a la cepa *E. coli* BL21 (DE3) sin vector y como control positivo de expresión una clona del vector pLATE conteniendo el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa.

2.2.8 Análisis de expresión de la proteína en un cultivo líquido

Se inocularon las clonas recombinantes conteniendo presuntamente el gen de esterasa EstAS2, EstAS3A, EstAS3B, y EstAS10 en 20 mL de medio líquido LB con 50 mg/ml ampicilina (agente de selección), además, se inoculó en medio líquido sin antibiótico la cepa BL21 sin transformar. Los cultivos fueron cosechados después de incubarlos durante toda la noche a 37° C con agitación (200 rpm).

Posteriormente estos cultivos (2%) fueron usados para inocular 1 litro de medio LB líquido y se cultivó como se describe previamente, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 (600 nm) y se indujo con 0.1 mM de IPTG durante 5 horas. Los cultivos fueron centrifugados a 4,000 g durante 20 minutos a 4 ° C y el sobrenadante fue descartado. El cultivo celular fue resuspendido en una solución amortiguadora de unión (10 mM de imidazole, 300 mM de NaCl, 50 mM de NaH₂PO₄ pH 8.0) y sonicados en un Ultrasonic Cleaner (Cole-Parmer, model EW-08895-16) durante 10 min. Los extractos fueron centrifugados a 12,000 x g a 4 °C y los sobrenadantes fueron transferidos a tubos nuevos Eppendorf. Como control, se usó la cepa silvestre BL21 (DE3) sin transformar fue también lisada y la proteína fue recuperada para su posterior análisis.

Se determinó la presencia de actividad de los lisados por el método de difusión en placas

(empleando papel filtro), mojando el papel con 10 μ l de sobrenadante y depositando el papel mojado sobre placas de agar conteniendo tributirina como sustrato.

2.2.9 Cuantificación de proteínas totales

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de BCA usando Albúmina de Suero Bovino como estándar (BSA), de acuerdo con las indicaciones del fabricante "BCA™ Protein Assay Kit–Reducing Agent Compatible, PIERCE" (Cat. Núm. 23250). Las muestras analizadas fueron los extractos lisados de las cepa BL21, los extractos lisados de la clona EstAS3B y la proteína purificada.

2.2.10 Purificación de la proteína EstAS3B: Monitoreo de actividad mediante ensayo de difusión en discos

La proteína EstAS3B fue purificada empleando el método de cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés) con resina Ni-NTA (QIAGEN, cat. núm. 301210). Para ello primero se preparó la columna con 1 ml de agarosa níquel, y se equilibró adicionándole 10 ml de 10 mM de Imidazole, 300 mM de NaCl, 50 mM de NaH_2PO_4 , pH 8.0 (buffer de equilibrio). Posteriormente se cargó el extracto citosólico; las proteínas contaminantes fueron eliminadas lavando con 10 mM de Imidazole en 300 mM de NaCl, 50 mM de NaH_2PO_4 pH 8.0 y EstAS3B fue eluida en 250 mM de Imidazole en 300 mM de NaCl, 50 mM de NaH_2PO_4 pH 8.0. Las fracciones eluidas de la proteína fueron colectadas y se le adicionaron glicerol 10 % v/v).

El sobrenadante obtenido después de la lisis fue evaluado empleando el método de difusión en placa mencionado anteriormente.

Así mismo, se aplicó en papel filtro 10 μ l de la proteína EstAS3B eluida de la columna de níquel.

Se determinó la presencia de actividad de esterasa mediante la presencia de un halo claro alrededor del papel filtro.

2.2.11 Electroforesis de Proteínas (Análisis SDS-PAGE)

El análisis del perfil de proteínas en las muestras se llevó a cabo realizando una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), se analizó

en cada caso 10 μg de proteína en un gel de 10 % de poliacrilamida. La proteína fue resuelta a 80 voltios durante 2 horas, posteriormente el gel fue teñido con 20 ml de Pageblue Protein Staining Solution (Thermo Scientific), a 50 rpm durante 1 hora (Ausubel, 2003).

2.2.12 Caracterización bioquímica de EstAS3B

Un ensayo enzimático se basa en la actuación de la enzima sobre una sustancia, llamada sustrato, catalizando su conversión en otra específica, conocida como producto. Comúnmente algún elemento de los que intervienen en la reacción absorbe luz a una longitud de onda determinada, con lo que la reacción puede seguirse por colorimetría o espectrofotometría (Marangoni, 2003).

Se elaboró una curva estándar empleando diferentes concentraciones de p-nitrofenol (0.01-0.18 μM); se preparó una solución madre ("stock") de 10 mM de p-nitrofenol, disuelto en isopropanol. La curva se construyó diluyendo el stock en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7.5 en un volumen final de 1ml y cuantificando la absorbancia en el espectrofotómetro DU-650 (Beckman Coulter) a 410 nm.

2.2.13 Determinación de longitud de cadena (sustrato preferido)

Se emplearon p-nitrofenol ésteres con diferentes longitud de cadena hidrocarbonada (Sigma-Aldrich): pNP butirato (C4), pNP octanoate (C8), pNP decanoato (C10), pNP dodecanoato (C12), pNP miristato (C14) and pNP palmitato (C16). La actividad enzimática se detectó con base en la hidrólisis del enlace éster entre el grupo acilo y el p-nitrofenol (acilo-pNP); de esta manera se libera el p-nitrofenol (p-NP), el cual a pH alcalino o neutro es de color amarillo y absorbe a 410 nm.

Cada reacción enzimática contenía 50 mM de buffer fosfato de sodio pH 7.5, Tritón 0.4 %, 1 mM de cada p-nitrofenol éster disuelto en Isopropanol y 40 ng de la enzima EstAS3B pura. La producción de p-nitrofenol fue continuamente monitoreada a 410 nm empleando un espectrofotómetro DU-650 (Bekman Coulter) durante 10 minutos a 40° C. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar un μmol de p-nitrofenol por minuto.

Las reacciones fueron hechas por triplicado en celdas de 1 cm de espesor, se incluyó una

reacción blanco (sin enzima) para cada sustrato.

2.2.14 Determinación de los parámetros cinéticos

Para evaluar los parámetros cinéticos, los ensayos fueron realizados empleando diferentes concentraciones de p-NP butirato (0.01-1 mM), el cual fue el sustrato ante el cual mostró la mayor preferencia. La mezcla de reacción contenía buffer fosfato pH 7.5, y 40 ng de la enzima pura. Se incluyó una reacción blanco (sin enzima). La absorbancia fue monitoreada durante 10 minutos a 410 nm a 40 °C; en todos los casos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Los datos obtenidos con cada concentración del sustrato fueron graficados y se obtuvo una pendiente, la cual fue considerada como la velocidad inicial, y estos valores fueron tomados para determinar los parámetros de K_m y V_{max} .

2.2.15 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática, los ensayos fueron realizados en 50 mM de buffer fosfato de sodio pH 7.5, Tritón 0.4 %, 1 mM de p-nitrofenol butirato (C4) disuelto en Isopropanol y 40 ng de la enzima EstAS3B pura.

La producción de p-nitrofenol fue monitoreada a 410 nm de manera continua durante 10 minutos en el espectrofotómetro DU-650 (Bekman Coulter) conectado a un controlador de temperatura y fijando la temperatura a 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C y 65°C.

2.2.16 Estabilidad en diferentes temperaturas

Para determinar la estabilidad en diferentes temperaturas, la enzima pura fue incubada a 20 °C, 30°C, 40°C, 50 y 60 °C durante 30 minutos. Los ensayos de actividad fueron realizados en buffer fosfato pH 7.5 a 40 °C durante 10 minutos. Como control se empleó una reacción con enzima sin incubar, cuya actividad se consideró como el 100%.

2.2.17 Efecto del pH sobre la actividad de la enzima

Para evaluar el efecto del pH sobre la actividad enzimática, se emplearon diferentes amortiguadores: acetato de sodio (pH 5-6), fosfato de sodio (pH 6.5-7.5), tris (pH 8-9),

carbonato (pH 9.5-10).

Las reacciones fueron llevadas a cabo en la mezcla del amortiguador, 0.4 % de Tritón X-100, 40 ng de EstAS3B pura y 1 mM de p-NP-Butirato; la liberación de pNP se cuantificó durante 10 minutos a 40 °C. Esta temperatura fue fijada en los ensayos debido a que en los análisis de temperatura 40 °C fue la óptima.

2.2.18 Caracterización *in silico* de EstAS3B

Los marcos de lectura abiertos en el contig de la clona 3 fueron identificados usando el programa Geneious 7.1. Este programa permite utilizar la herramienta Glimmer de predicción de genes comparando con la base de datos de bacteria del NCBI, usando BLAST. El mapa genético del contig 3 fue nuevamente dibujado en el programa ApE Plasmid y editado con el software Inkscape 0.91.

2.2.19 Predicción de péptido señal y dominios transmembranales

La predicción de existencia de péptido señal, identificación de dominios alfa y beta transmembranales y estimación del peso molecular fueron determinados usando los programas Signal P 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), TMHMM y Boctopus; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/> y <http://boctopus.cbr.su.se/> y ProtParam <http://web.expasy.org/protparam/>, respectivamente.

2.2.20 Análisis filogenético de EstAS3B

Con la finalidad de asignar una familia al gen en estudio se realizó una búsqueda de motivos conservados característicos descritos en cada familia (Arpyginy *et al.*, 1999).

Para realizar el árbol filogenético se emplearon secuencias de esterasas pertenecientes a la familia IV, la mayoría de ellas cristalizadas, las cuales fueron reportadas por Kourist *et al.*, 2010; (también se incluyeron algunas esterasas descubiertas mediante metagenómica y dos secuencias seleccionadas al azar de la familia VII.

2.2.21 Modelamiento molecular de EstAS3B

La secuencia deducida de aminoácidos de la EstAS3B fue enviada al servidor I-Tasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), el cual identificó 5 modelos

estructuralmente parecidos al modelo que predice para EstAS3B. Se consideró el mejor modelo, es decir el que tuvo el porcentaje de identidad y valor Z-score más alto, y a partir de este se localizó el probable sitio catalítico de la proteína, el cual se señaló en la estructura graficada en Pymol. La superposición estructural fue realizada con Mustang-MR Structural Sieving Server (<http://pxgrid.med.monash.edu.au:8080/mustangserver/>). También se realizó una búsqueda de proteínas que son estructuralmente similares en BLASTP contra la base de datos de proteínas (Protein Data Bank, PDB).

2.3. RESULTADOS

2.3.1 Diseño de cebadores

En el cuadro 2.2 se presentan los cebadores diseñados en este trabajo. En el contig 3 (perteneciente al fosmidio 3) se encontraron 2 esterasas, a las que en lo subsiguiente se les mencionará como EstAS3A y EstAS3B. Los cebadores diseñados para su clonación en pLATE se nombraron como EstAS3A, EstAS3B, EstAS8 y EstAS10; la temperatura de alineamiento fue estandarizada en la PCR, empleándose 53 °C en todos los casos, a pesar de que teóricamente fueron diseñados con una temperatura de alineamiento de 60°C. Estos cebadores contenían adaptadores (secuencias homólogas al vector en el cual se ligarían los productos de PCR) y estas secuencias de nucleótidos pudieron interferir con la temperatura de alineamiento.

Cuadro 2.2 .Cebadores usados en este trabajo para la clonación del gen de interés en el vector pLATE.

Nombre del cebador	Nombre del ORF	Secuencia de cebadores	Tamaño esperado (pb)
EstAS8	EstAS2	FW5' <u>GGTTGGGAATTGCAAATGAAGCCGATCAGGGACG</u> CCATC 3' RV5' <u>GGAGATGGGAAGTCATCAGGCAGTGGTTTCGCGC</u> ACAAA3'	849

EstAS3A	EstAS3A	FW 5' <u>GGTTGGGAATTGCAAATGACCGCGCTGCTCGTCAC</u> 3' RV 5' <u>GGAGATGGGAAGTCATCACGCAGGCACCAGCCG</u> 3'	981
EstAS3B	EstAS3B	FW5' <u>GGTTGGGAATTGCAAATGAAGCGTCTTGCCATCGCC3'</u> RV5' <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCTTGGCCGGCCTTT</u> GCAGTCAACAG3'	909
EstAS10	EstAS10	FW5' <u>GGTTGGGAATTGCAATTGCAAATTTTAGGTGCGCAA</u> AGCCTATGC 3' RV5' <u>GGAGATGGGAAGTCATTAAATTTCCACTCGGTTCA</u> GCCCTAAATCA3'	804

* La región subrayada corresponde a la región que traslapa con el vector. La región no subrayada corresponde a la secuencia específica del gen de interés

Extracción de ADN de los Fósmidos

En la Figura 2.2 se puede observar los ADN de los fósmidos extraídos de las clonas que se identificaron funcionalmente con actividad de esterasa; se obtuvieron altas concentraciones de ADN tal como se puede observar en el cuadro 2.3. Estos ADNs fueron utilizados para realizar las amplificaciones de los ORFs de esterasas.

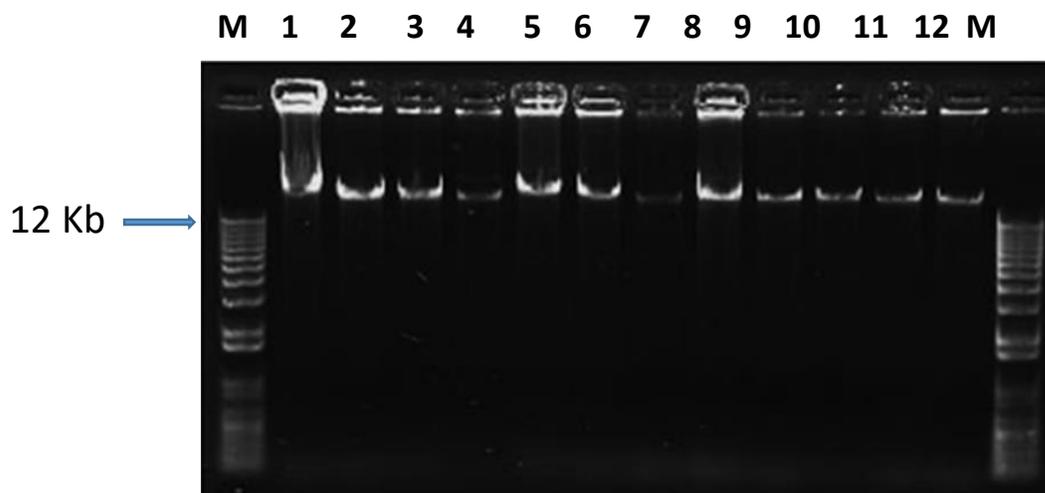


Figura 2.6. ADNs de los fósidos identificados funcionalmente conteniendo esterasas, M, Marcador de Masa molecular, 1-12 números asignados arbitrariamente a los fósidos que presentaron actividad.

Cuadro 2.3. Concentraciones de ADNs de los fósidos.

Fósmido	Concentración ng/μl
1	907
2	727
3	564
4	518
5	987.8
6	706.2
7	1402.5
8	1573
9	1018
10	1303
11	1200.3
12	1093.0

2.3.2 Correlación de los genes de esterasas identificados con la clona metagenómica

En este ensayo se muestra la correlación de los ORFs de esterasas identificados en la secuenciación de “pools” de fósidos y las clonas específicas que los contienen. El ensayo para la correlación se realizó mediante PCR utilizando los cebadores del cuadro 2.2. y usando como templado mezclas de los ADNs de los fósidos (Fig. 2.3 A y 2.3 B). Con base en los resultados se asignaron los ORFs de esterasas a las clonas correspondientes (Cuadro 2.4).

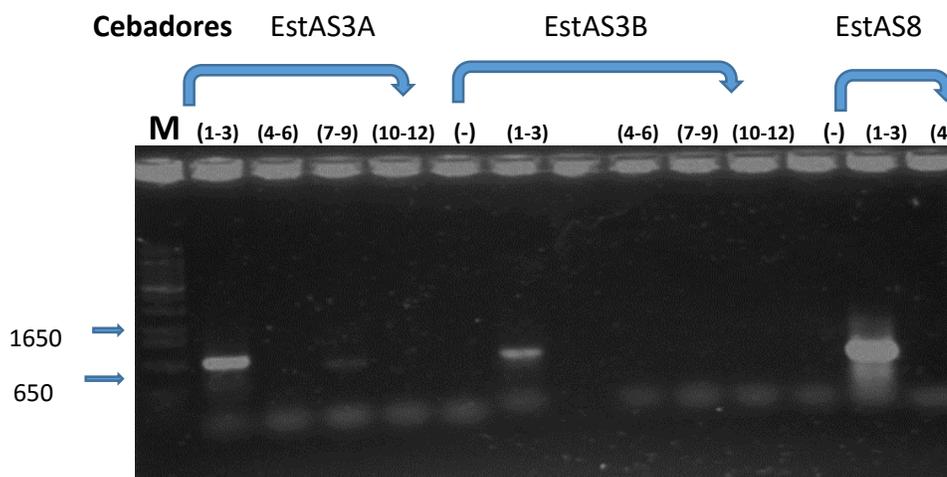


Figura 2.3 A. Identificación de clonas que contienen los marcos de lectura de esterasas en las muestras secuenciadas por pool. Los cebadores usados para identificar los EstAS3A, EstAS3B y EstAS2 fueron nombrados inicialmente EstAS3A, EstAS3B y EstAS8, respectivamente. M, Marcador de masa molecular.

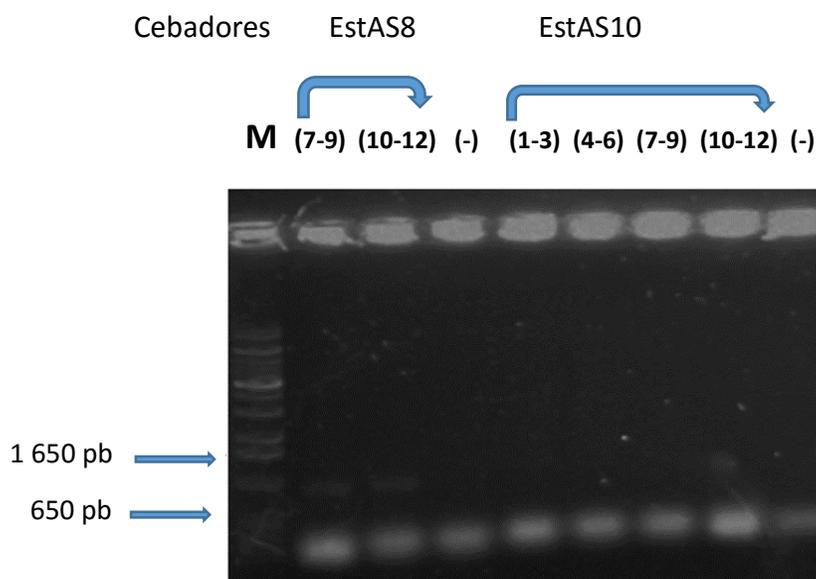


Figura 2.3 B. Identificación de clonas que contienen los marcos de lectura de esterasas en las muestras secuenciadas por pool. Los cebadores usados para identificar los EstAS2 y EstAS10 fueron nombrados inicialmente, EstAS8 y EstAS10, respectivamente. M, Marcador de masa

Cuadro 2.4. Preparación de las clonas para su envío a secuenciación

Combinación de ADN de fósmidos	Cebadores	ORF identificado	Tamaño obtenido (pb)
1-3	EstAS3A	EstAS3A	981
1-3	EstAS3B	EstAS3B	909
1-3	EstAS8	EstAS2	849
10-12	EstAS10	EstAS10	804

Los cuatro ORFs de esterasas fueron amplificados y clonados en el vector TOPO TA (datos no mostrados), y secuenciados por la empresa Macrogen (Corea). El alineamiento mostró

100 % de identidad entre las secuencias de los ORFs clonados en TOPO y las secuencias identificadas en los contig de los fósmidos, excepto en el ORF EstAS3A, en el cual se encontró una diferencia de un nucleótido entre el contig y el ADN subclonado.

2.3.4 Subclonación en el vector de expresión pLATE

Se lograron buenas amplificaciones a partir de 30 ng de ADN templado en reacciones de PCR de 50 μ l (Fig. 2.4); estas bandas de ADN se purificaron y analizaron de nuevo en gel (Fig. 2.5). Se obtuvieron los tamaños esperados: para el ORF EstAS2 el tamaño fue de 849 pb, para el EstAS3A de 981 pb, EstAS3B 909 pb y para el EstAS10 de 804. En todos los casos se obtuvieron concentraciones mayores a 80 ng/ μ l.

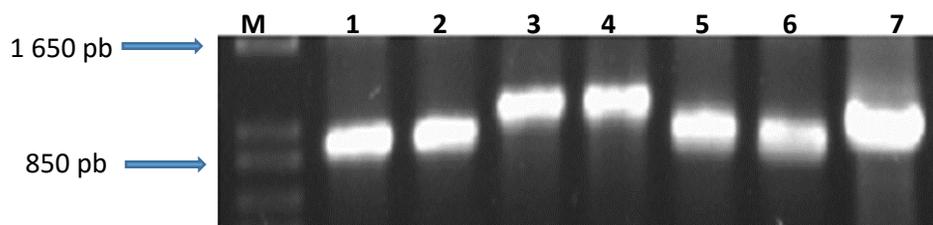


Figura 2.4. Amplificación de los marcos de lectura completos de los genes de esterasas identificados en las clonas metagenómicas en este trabajo. Carriles 1 y 2, EstAS2; carriles 3 y 4, EstAS3A; carriles 5 y 6, EstAS3B; carril 7, EstAS10; M, marcador de masa molecular.

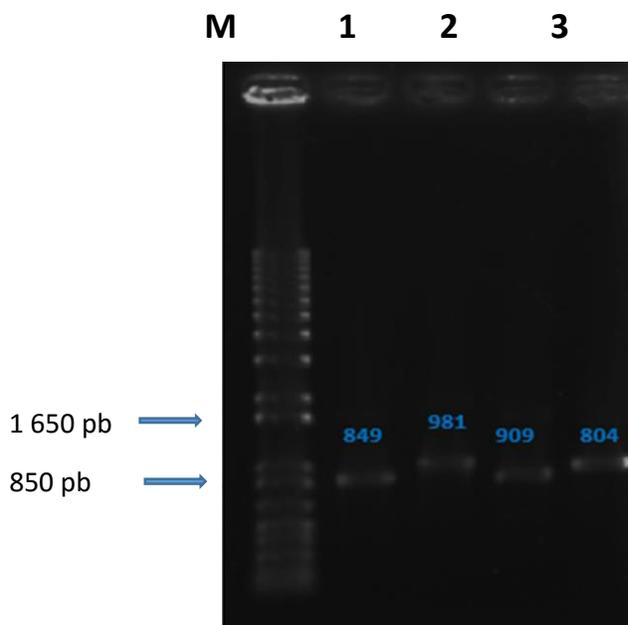


Figura 2.5. Productos de PCR purificados con el kit “Gel Extraction” de QIAGEN. Carril 1, EstAS2; carril 2, EstAS3A; carril 3, EstAS3B; carril 4, EstAS10; M, marcador de masa molecular

2.3.5 Verificación de la clonación

En la Figura 2.6 A y 2.6 B se puede observar el análisis por PCR en colonia de las clonas en el vector de expresión pLATE. Se muestran los ORFs EstAS2, EstAS3A EstAS3B EstAS10; además se clonó el gen de la cloranfenicol acetil transferasa (720 pb) y esta subclonación fue usada como control de clonación. Para esta amplificación se emplearon los cebadores incluidos en el Kit pLATE, los cuales flanquean los insertos clonados. Los fragmentos obtenidos mediante PCR corresponden a los tamaños esperados, resultado de la suma de los respectivos ORFs más 260 pb del vector.

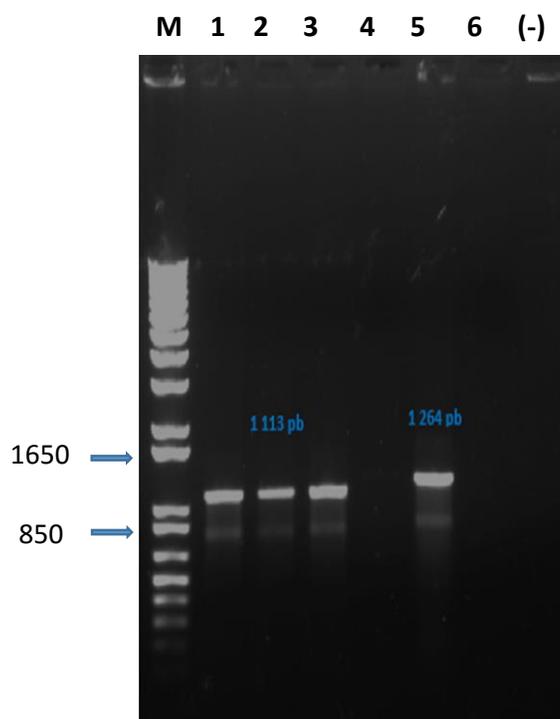


Figura 2.6 A. Análisis por PCR en colonia de las clonas en pLATE conteniendo los ORFs. Carriles 1-3, EstAS2; Carriles 4-6, EstAS3A, carril (-), control negativo de PCR. M, marcador de masa molecular.

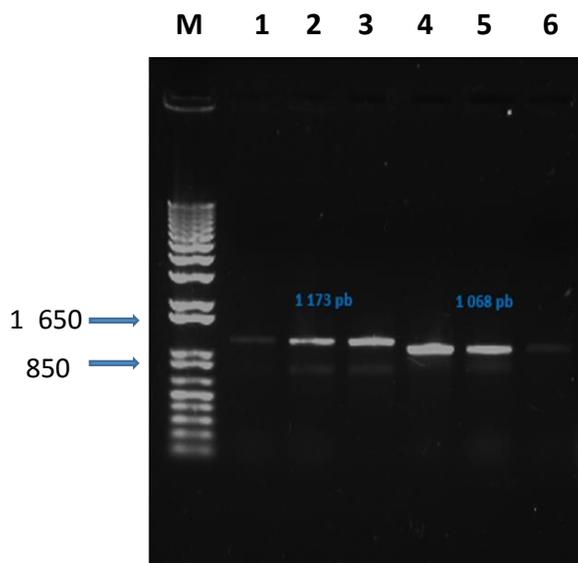


Figura 2.6 B. Análisis por PCR en colonia de las clonas en pLATE conteniendo los ORFs. Carriles 1-3, EstAS3B y carriles 4-6, EstAS10. M, marcador de masa molecular.

Adicionalmente se realizó una PCR a partir de la ADN plasmídico (pLATE conteniendo el gen de interés) de cada una de las construcciones generadas; se incluyó el control conteniendo el gen de la cloranfenicol acetil transferasa, mencionado anteriormente (Fig. 2.7).

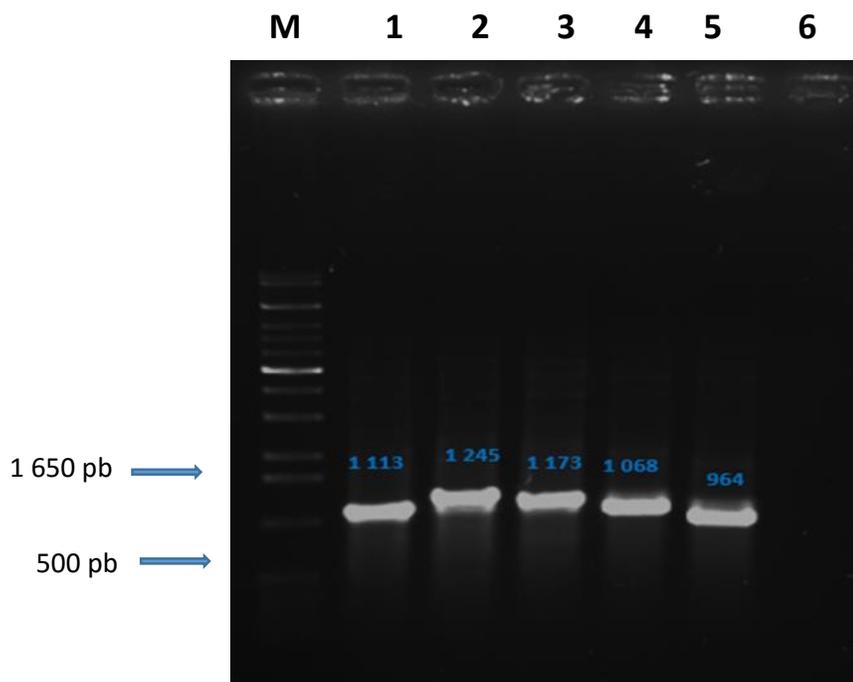


Figura 2.7. Verificación de la clonación en el vector de expresión pLATE mediante PCR de los ORFs carril 1, EstAS2; carril 2, EstAS3A; carril 3, EstAS3B; carril 4, EstAS10, carril 5, CAT (cloranfenicol acetil transferasa) a partir de los ADN plasmídicos purificados y usados como templado, carril 6, control negativo de PCR; M, marcador de masa molecular.

Evaluación de las clonas en pLATE mediante enzimas de restricción

En la Figura 2.8 se puede observar el análisis de cada construcción con las enzimas de restricción Xba I y Stu I. Se liberaron los insertos del vector y en cada caso coincidió con el tamaño esperado de 4500 pb, y el tamaño de los insertos respectivos corresponden a los tamaños esperados.

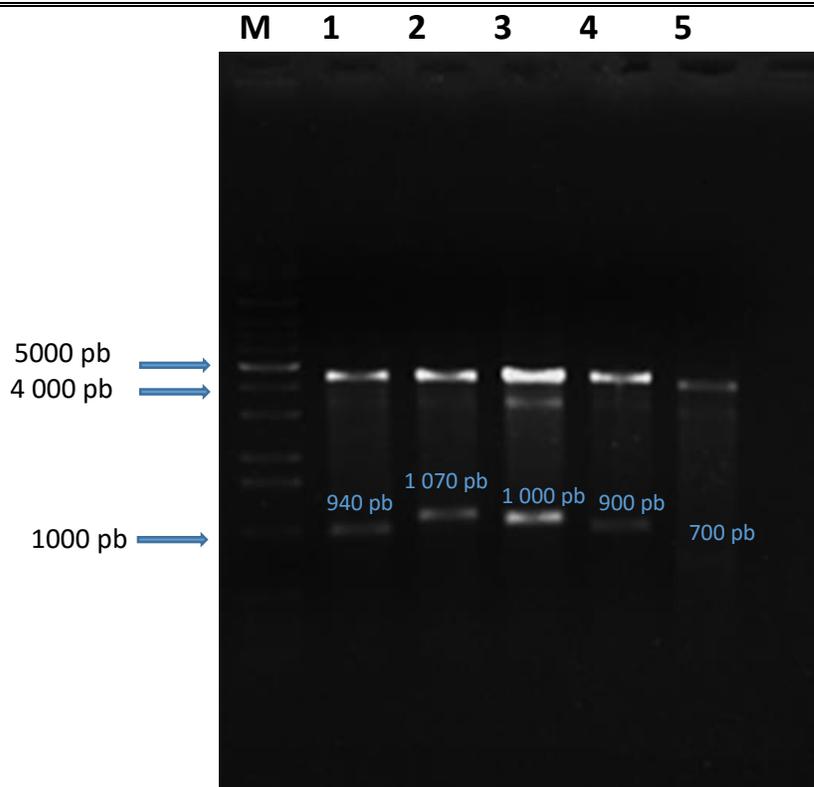


Figura 2.8. Digestión con las enzima XbaI y StuI de los constructos en el vector pLATE liberándose los insertos respectivos: carril 1, EstAS2; carril 2, EstAS3A; carril 3, EstAS3B, carril 4, EstAS10; carril 5, CAT (Cloranfenicol acetil transferasa). M, marcador de masa molecular.

2.3.6 Análisis funcional en placas de LB y tributirina

El análisis funcional de la clona de pLATE-EstAS3B permitió detectar actividad, la cual fue observada como un halo alrededor de la colonia crecida sobre LB conteniendo tributirina como sustrato y ampicilina como agente de selección. El análisis fue monitoreado a las 12 horas de incubación a 37 °C (Fig. 2.9). Los genes EstAS2, EstAS3A y EstAS10 clonados en pLATE no presentaron actividad extracelular (Fig. 2.10).

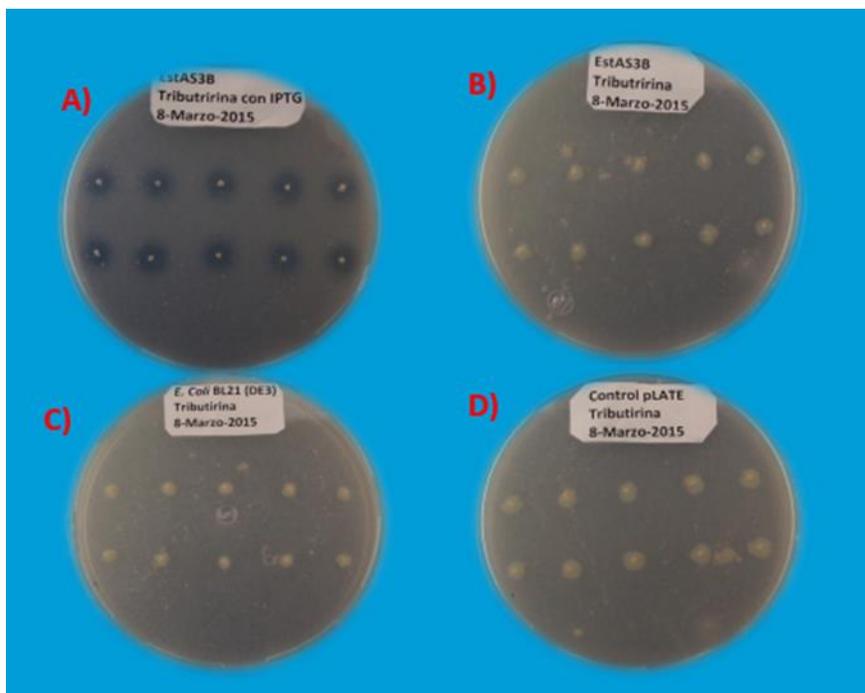


Figura 2.9. Análisis funcional de actividad esterasa de la clona en el sistema de expresión aLICator pLATE-EstAS3B. La clona fue cultivada sobre LB-tributirina-ampicilina A) inducción con 0.1 mM de Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG); B) sin IPTG, y C) Cepa BL21 silvestre, sin vector, empleada como control negativo, D) clona en el sistema de expresión aLICator conteniendo el gen de la cloranfenicol acetil transferasa en el vector pLATE (segundo control negativo).

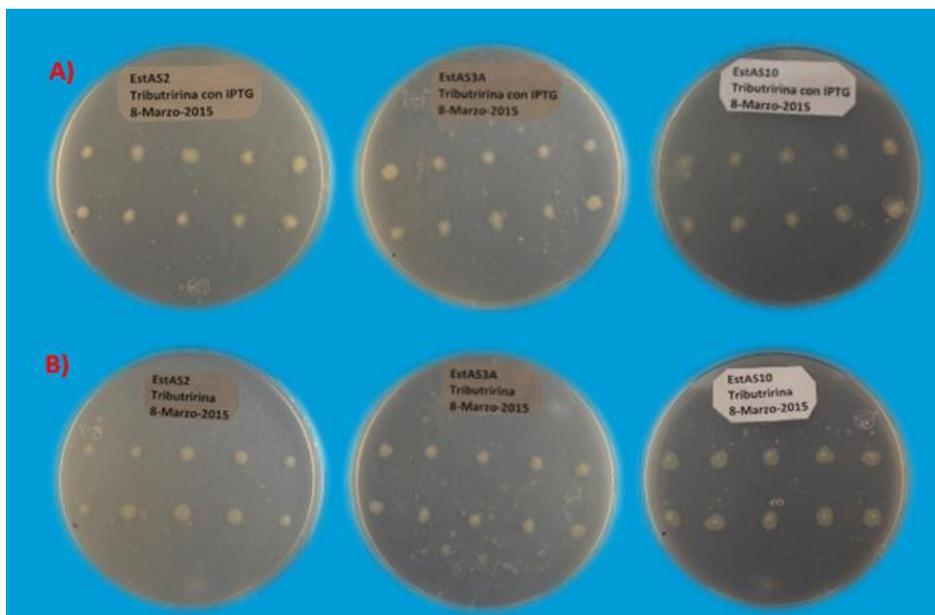


Figura 2.10. Análisis funcional de actividad de esterasa de las clonas en el vector de expresión pLATE de los ORFs EstAS2, Est3A, EstAS10 A) medio LB con tributirina (sustrato), ampicilina (selector) e IPTG (inductor de expresión). B) idéntico a A, pero sin inductor.

2.3.7 Análisis de expresión de la proteína en un cultivo líquido

Debido a que se observó actividad extracelular de esterasa en la clona pLATE31- EstAS3B en los cultivos sólidos, esta clona se cultivó posteriormente en medio líquido con ampicilina a 50 mg/ml de y 0.1 mM de IPTG. Se recuperó el sobrenadante y se evaluó la actividad de esterasa mediante el ensayo de difusión en placa; el resultado fue negativo, es decir no hubo actividad en el sobrenadante a pesar de la adición del IPTG, “no se presentan los resultados”. Por lo tanto se procedió a sonicar las células para liberar el contenido interno; la actividad de esterasa fue detectada en el citosol (sobrenadante del lisado). Los resultados se presentan en la Figura 2.11 (panel 1A). Igualmente, se observó halo de actividad con la proteína después de purificación (Fig. 2.11, panel 2A), lo que muestra que se recupera de manera activa.

Para identificar las fracciones proteicas en las que eluye EstAS3B en la columna de níquel se monitoreó la actividad de esterasa mediante ensayo de difusión en placa. Se observan 2 picos de elución, el primero en las fracciones 1-3 y el segundo en las fracciones 9-17,

siendo las fracciones 9 y 10 donde eluye la mayor actividad. La actividad observada en las fracciones 1-3 corresponden a la proteína EstAS3B que no logró pegarse a la columna, por saturación de ésta, mientras que las fracciones 4-7 corresponden al lavado. A partir de la fracción 8 corresponde la elución.

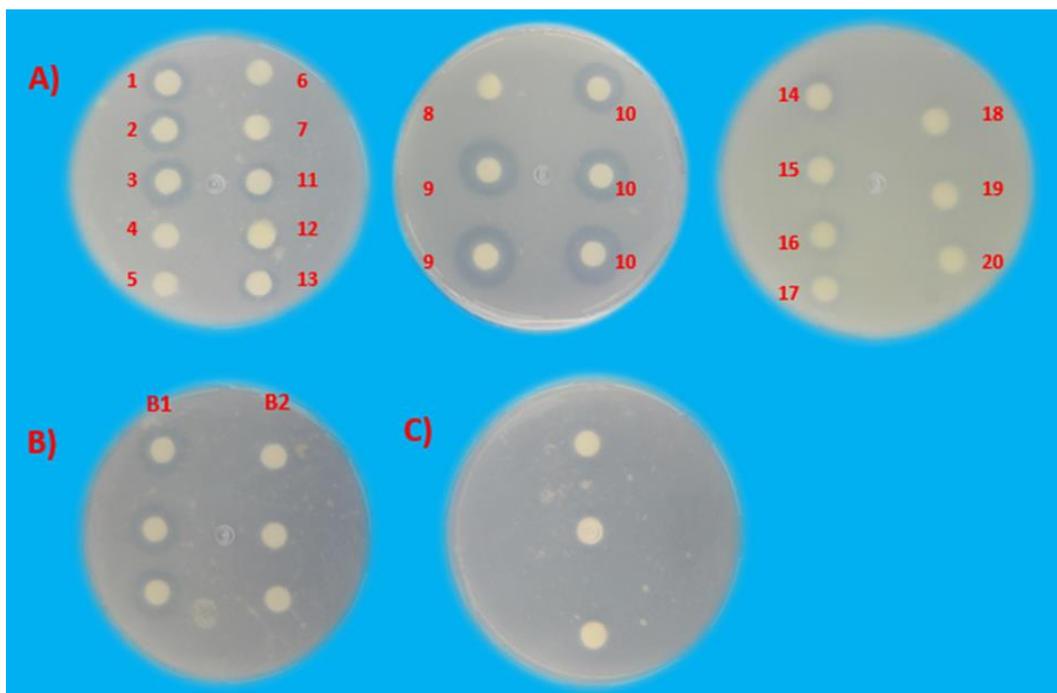


Figura 2.11. Ensayo de actividad de esterasa en difusión en placa de EstAS3B durante el proceso de purificación. Panel A; corresponde a las fracciones colectadas durante la purificación, 1-3 fracciones que eluyeron inmediatamente después de agregar el extracto lisado a la columna de níquel; 4-7 fracciones colectadas después de agregar el buffer de lavado, 8-20 fracciones colectadas después de agregar el buffer de elución, el cual contenía una alta concentración de imidazole (250 mM). Panel B; extracto lisado de pLATE- EstAS3B; inducido con 0.1 mM de IPTG y B2 sin inducir. Panel C, extracto lisado de BL21 (D3) empleado como control negativo

Análisis funcional de los genes EstAS2, Est3A, EstAS10

También se realizó el ensayo de difusión en placa para detección de esterasa para las clonas de los genes EstAS2, EstAS3A y EstAS10, utilizando tanto el medio libre de células como la fase soluble después de la lisis celular, pero en los 3 casos no se detectó actividad de esterasa (Fig. 2.12).

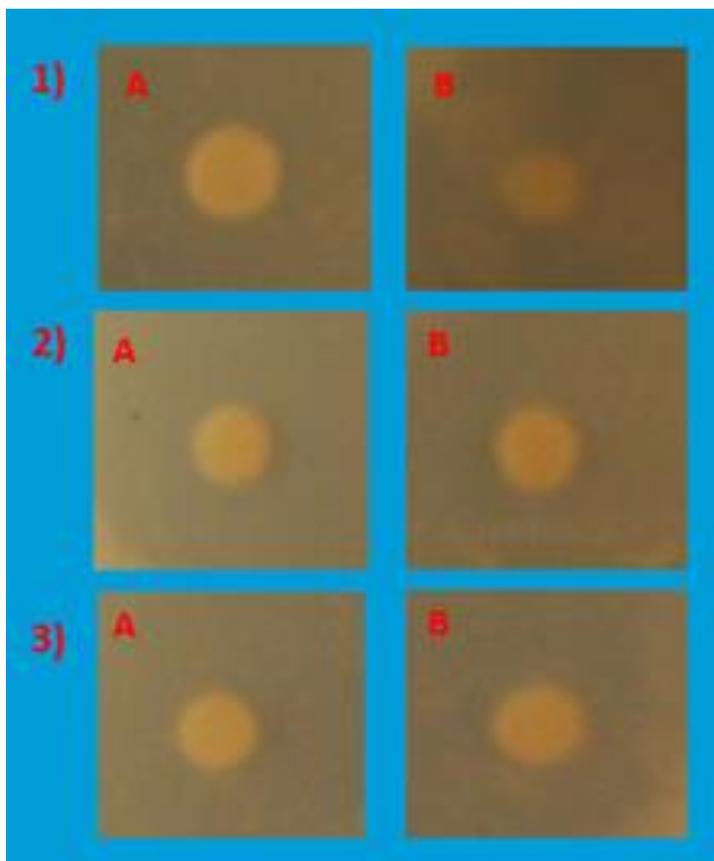


Figura 2.12. Análisis funcional de actividad de esterasas mediante ensayo de difusión en placas (papel filtro sobre medio selectivo para detección de esterasas. Los ensayos 1, 2 y 3 corresponden al extracto soluble después de la lisis celular de las clonas con los genes EstAS2, Est3A y EstAS10 respectivamente. Panel A, se indujo con 0.1 mM de IPTG; B) sin inducir.

2.3.8 Cuantificación de proteínas por el método BCA (Ácido bicinonónico)

En el cuadro 2.5 se presenta el resumen de la purificación de proteína EstAS3B. Se partió de 8.33 mg de proteína y se recuperó 2.24 mg, o sea 26% de la proteína soluble es EstAS3B. Se puede observar que en el extracto total inducido se obtuvo 2.082 de un total de 4 ml cargados en la columna de purificación, cabe señalar que solo se cuantificaron las proteínas en las fracciones que mostraron mayor actividad en el análisis funcional descrito anteriormente (fracciones 9-12). Se puede decir que la proteína está muy enriquecida en el eluato y que se recuperó un cuarto de la proteína total.

Cuadro 2.5. Proteínas cuantificadas método de BCA (Ácido bicinconínico)

	Concentración de proteína (mg/ml)	Vol. (ml)	Proteína total
Extracto crudo	2.083	4	8.33 mg
Eluato puro (fracciones 9-12)	1.242	1.8	2.24 mg

2.3.9 Electroforesis de Proteínas (SDS-PAGE)

En la Figura 2.13 se puede observar el análisis electroforético en gel disociante de poliacrilamida de las proteínas intracelulares solubles (fase soluble después de lisis) de BL21 (DE3), usado como control, así como los extractos crudos de la clona pLATE-EstAS3B sin inductor (Fig. 2.13, carril 2) y con inductor (Fig. 2.13, carril 3). En el extracto del cultivo en presencia del IPTG se observa una banda extra, abundante, de aproximadamente 32 KDa que no está en el extracto del cultivo sin inductor. En los carriles 6-9 se observó una banda intensa de aproximadamente 32 KDa, es claro que en el carril 6 la proteína de interés se encuentra con otras proteínas y se va alcanzando una mejor pureza sucesivamente hasta llegar al carril 9.

El tamaño de la proteína purificada de 32 KDa, coincide con la predicción *in silico*.

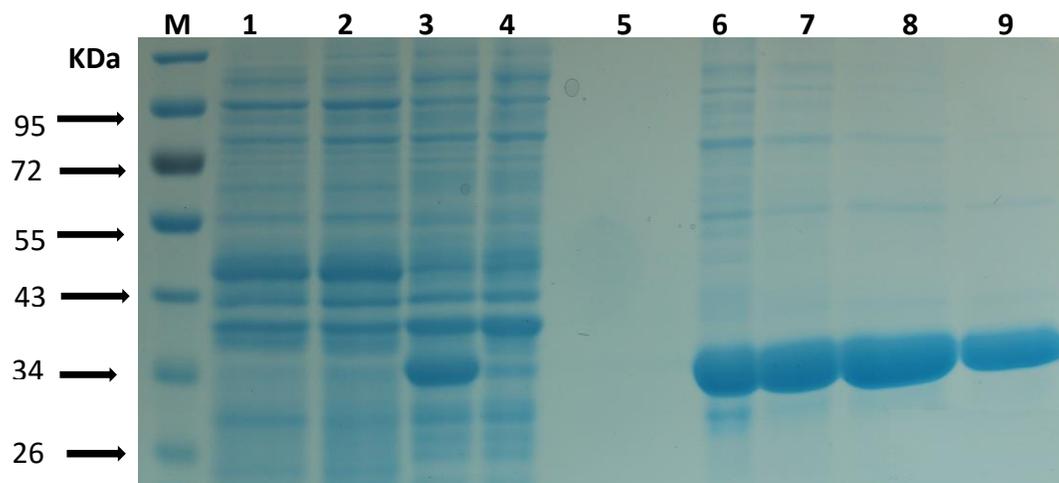


Figura 2.13. Análisis SDS-PAGE de la purificación del perfil de proteínas durante la purificación de EstAS3B. Se cargó 10 µg de proteína por carril y al final de la electroforesis el gel fue teñido con Coomassie Blue. Carril M, Marcador de masa molecular de proteínas; carril 1, extracto proteico del lisado de la cepa silvestre BL21 (DE3), carril 2, extracto proteico del lisado de pLATE- EstAS3B sin inducir; carril 3, extracto proteico del lisado de pLATE- EstAS3B inducido con 0.1 mM de IPTG; carril 4, flujo obtenido después de agregar el extracto proteico de EstAS3B a la columna (proteína que no logro unirse a la columna); carril 5, lavado, carriles 6-9 fracciones obtenidas de la proteína purificada en columna de níquel.

2.3.10 Caracterización bioquímica de EstAS3B

Para los cálculos de actividad enzimática es necesario convertir los valores de densidad óptica por minuto en micromoles de producto usando las mismas condiciones de reacción hechas en las mediciones cinéticas.

La figura 2.14 corresponde a los resultados de la curva estándar de las absorbancias del pNP a 410 nm. Se logró una correlación de 0.99 (R^2) por lo que la concentración de pNP liberado en las reacciones enzimáticas pueden estimarse confiablemente usando esta curva estándar.

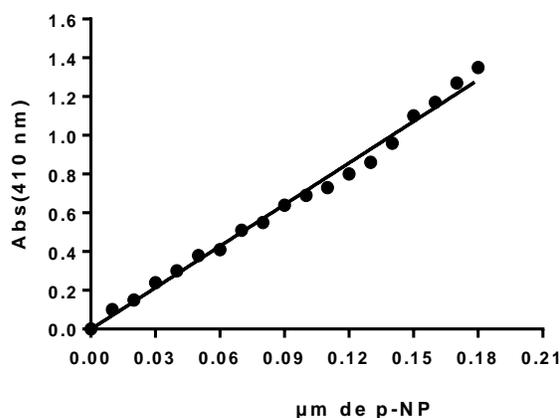


Figura 2.14. Curva estándar del p-nitrofenol (pNP) usando un volumen de 1 ml de cada concentración disuelto en 10 % de isopropanol y ajustando el volumen de 1ml con el amortiguador fosfato de sodio pH 7.5.

2.3.11 Determinación de longitud de cadena (sustrato preferido)

Se determinó la especificidad del sustrato empleando p-nitrofenol ésteres con diferentes longitud de cadena hidrocarbonada; pNP butirato (C4), pNP octanoato (C8) pNP decanoato (C10), pNP dodecanoato (C12), pNP miristato (C14) y pNP palmitato (C16). Se empleó una concentración fija de enzima (40 ng), y 1 mM de cada uno de los sustratos.

La enzima mostró la mayor actividad con el pNP butirato, por lo que se definió como el 100 % para comparar los otros pNP-acilo. Es decir, bajo las condiciones estándar del ensayo, el sustrato preferido de EstAS3B es el pNP butirato (C4), sin embargo mantiene una actividad mayor al 60 % con pNP-octanoate (C8); la actividad cae abruptamente al 10 % cuando se evaluó con pNP-decanoato (C10). La enzima no mostró actividad al evaluarse con pNP dodecanoato (C12), pNP miristato (C14) y pNP palmitato (C16) (Fig. 2.15).

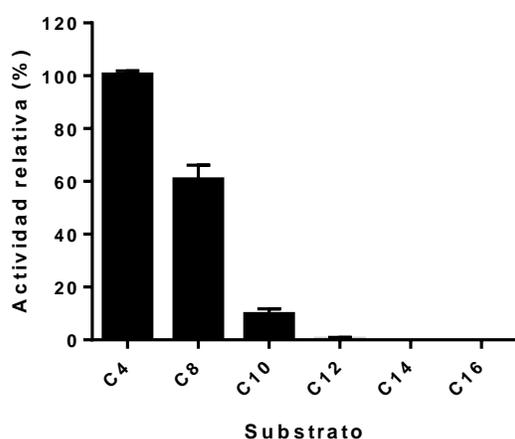


Figura 2.15. Determinación de la especificidad de EstAS3B por el sustrato, empleando diferentes pNP-ésteres.

2.3.12 Determinación de los parámetros cinéticos

En el modelo cinético de Michaelis Menten, el valor de K_m es la concentración de sustrato a la que se alcanza la mitad de la velocidad máxima (V_{max}). La V_{max} corresponde al valor máximo de actividad de la enzima, generalmente expresada en micromoles/min.

Las constantes cinéticas K_m y V_{max} fueron determinadas usando el software GraphPad.

La enzima muestra una K_m de 0.13 mM y una V_{max} de 1490 $\mu\text{mol}/\text{min}$ (Fig. 2.16). El valor bajo de K_m de la enzima nos indica la alta afinidad de la enzima por el pNP-butirato.

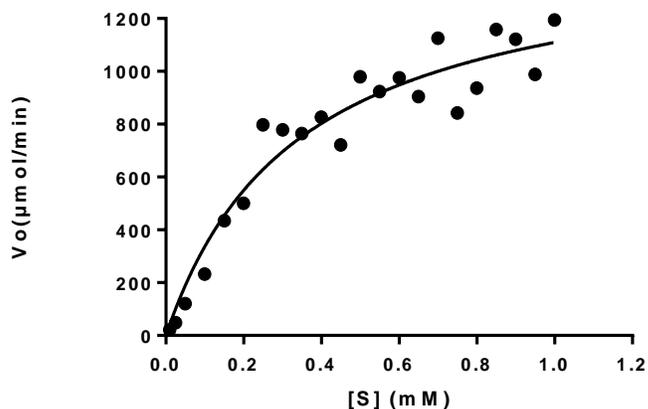


Figura 2.16. Comportamiento cinético de la enzima EstAS3B, graficado con el software GraphPad. El ensayo fue realizado usando diferentes concentraciones pNP-butirato, buffer fosfato pH 7.5 a 40° C.

2.3.13 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima

La temperatura óptima de la enzima se determinó variando la temperatura de reacción desde los 15 °C hasta los 65 °C, bajo las condiciones de ensayo estándar. La enzima mostró una actividad máxima a 40 °C, mantiene una actividad mayor al 60 % entre los 35 y 50 °C, y una baja actividad entre los 15 °C y los 25°, así como un descenso de la actividad enzimática a partir de los 55 °C (Fig. 2.17).

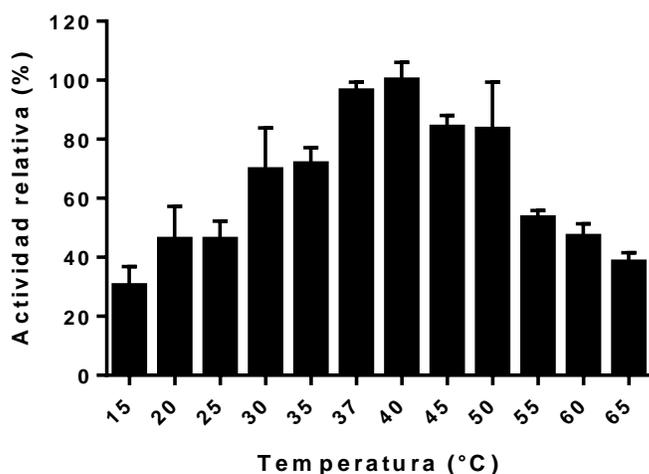


Figura 2.17. Actividad de esterasa de EstAS3B evaluada en diferentes temperaturas. El ensayo fue realizado empleando pNP-Butirato, cada temperatura fue monitoreada durante 10 minutos.

2.3.14 Estabilidad en diferentes temperaturas

La estabilidad térmica de la enzima fue determinada incubando la enzima a diferentes temperaturas (20° C, 30 °C, 40 °C, 50 °C y 60 °C) durante 30 minutos.

Una reacción con enzima sin incubar, fue empleada como control y su actividad fue considerada como el 100 %.

La enzima mantiene actividad mayor al 50 % a 20 °C, 30°C y 40 °C después de 30 minutos de incubación, y su actividad cae más del 90 % a 50 °C después de una hora y a 60 °C después de media hora de incubación (Fig. 2.18).

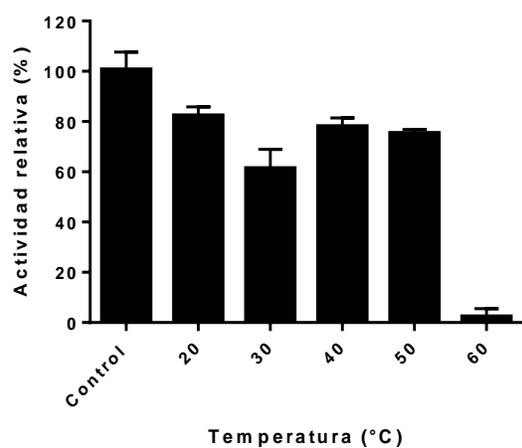


Figura 2.18. Actividad residual de esterasa de EstAS3B después de 30 minutos de incubación en diferentes temperaturas. El ensayo fue realizado empleando pNP-Butirato, cada temperatura fue monitoreada durante 10 minutos.

2.3.15 Efecto del pH sobre la actividad de la enzima

El efecto del pH sobre la actividad de la enzima EstAS3B fue evaluado en un rango de pH entre 5 y 10 con intervalos de 0.5. La enzima muestra su máxima actividad a pH 7.5, y mantiene actividad mayor al 60 % entre pH 8 y 9.5 (Fig. 2.19).

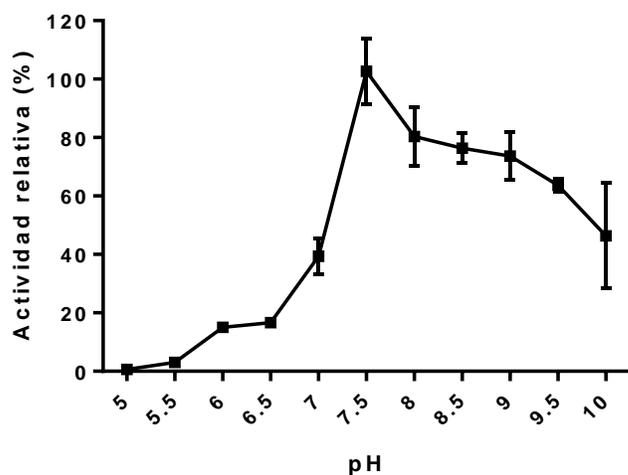


Figura 2.197. Efecto del pH sobre la actividad de esterasa de EstAS3B .Amortiguador

acetato de sodio (pH 5-6), fosfato de sodio (pH 6.5-7.5), tris (pH 8-9), carbonato (pH 9.5-10). El ensayo fue realizado empleando pNP-Butirato durante 10 minutos a 40 °C

2.3.16 Caracterización *in silico* de EstAS3B

2.3.17 Análisis BLASTX

En la Figura 2.20 se puede observar el mapa genético del contig del inserto del fósideo 3 de la biblioteca metagenómica. El contig consta de 23, 439 pb; el marco de lectura abierto de esterasa está representado con el número 32.

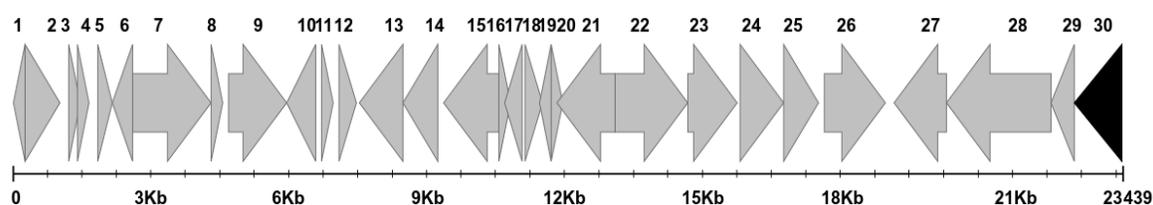


Figura 2.20. Mapa del inserto de fósideo 3, mostrando 30 marcos de lectura abiertos, identificados usando el software Geneious 7.1. El marco de lectura abierto 30, sombreado en negro, representa la esterasa EstAS3B.

En el cuadro 2.6 se muestran los 30 marcos de lectura abiertos identificados con el programa GLIMMER, se muestra su descripción basada en homología en el contig perteneciente al fósideo 3 de la biblioteca metagenómica en estudio. Cabe mencionar que de los 30 ORFs descritos en el cuadro, la mayoría presentó homología con el género *Sphingobium*. Entre las proteínas deducidas se encontraron ATP asas, tranposasas, proteínas de membrana, acil transferasa, glucósido hidrolasas, y algunas proteínas con función desconocida (proteína hipotética). La esterasa se encuentra hacia el 5', precedida por glucósidos hidrolasa y una proteína hipotética.

Cuadro 2.6. Proteínas deducidas a partir de los marcos de lectura abiertos identificados por el programa GLIMMER el cual usa modelos ocultos de Markov para identificar las regiones codificantes y distinguirlos de ADN no codificante, y función deducida basada en homología, comparando contra la base de datos del NCBI (software Geneious 7.1) en el contig perteneciente al fósideo 3 metagenómico en este estudio.

ORF n°	ORF comienzo /Termino	ORF (pb)	Descripción (número de acceso)	Microorganismo	% de Identidad	valor e-
1	105-281	105	ATPasa (WP5779443.1)	<i>Pseudomonas amygdali</i>	36	0.1
2	276-998	723	ATPasa (WP005779443.1)	<i>Pseudomonas amygdali</i>	41	8e-63
3	1191-1367	177	Determinante de estabilidad (WP037521786.1)	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	88	3e-22
4	1367-1642	276	Módulo de antitoxina (WP037521787.1)	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	73	3e-38
5	1807-2136	750	Proteína hipotética (WP019052499.1)	<i>Sphingomonadaceae</i>	99	4e-59
6	2120-2542	423	Transposasa (WP019052498.1)	<i>Sphingomonadaceae</i>	100	1e-74
7	2546-4210	1665	Transposasa (WP019052497.1)	<i>Sphingomonadaceae</i>	99	0.0
8	4228-4473	246	Proteína hipotética (WP019052496.1)	<i>Sphingomonadaceae</i>	100	3e-51
9	4587-5810	1224	Proteína hipotética V473_12610 (KMS55579.1)	<i>Sphingobium czechense LL01</i>	66	7e-115
10	5818-6420	603	Proteína hipotética (WP021227465.1)	<i>Sphingobium lactosutens</i>	76	7e-90
11	6555-6770	216	Proteína hipotética (WP048939071.1)	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	64	7e-22
12	6935-7294	360	Proteína de membrana (WP024018307.1)	<i>Sphingobium sp. C100</i>	94	7e-08
13	7358-8290	933	Electron de transferencia Flavoproteína subunidad beta (WP048577912.1)	<i>Sphingomonas sp. MEA3-1</i>	94	7e-179
14	8287-9036	750	Electron de transferencia Flavoproteína subunidad beta (WP025550216.1)	<i>Sphingomonadaceae</i>	97	8e-156
15	9133-10332	1200	Ligasa Malato-CoA subunidad beta (WP004207732.1)	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	98	0.0

16	10321-10473	153	Alcohol tipo deshidrogenasa (XP011213341.1)	<i>Bactrocera dorsalis</i>	46	2.9
17	10480-10848	369	Proteína hipotética (WP037491663.1)	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	65	5e-41
18	10892.11269	378	Proteína de membrana (WP021227457.1)	<i>Sphingobium lactosutens</i>	85	4e-73
19	11279-11452	174	Proteína hipotética V473_12650 (KMS55587.1)	<i>Sphingobium czechense LL01</i>	86	9e-27
20	11451-11582	132	Acil transferasa (XP007596152.1)	<i>Colletotrichum fioriniae PJ7</i>	37	7.9
21	11568-12776	1209	Protón anti portador de sodio (WP017181343.1)	<i>Sphingobium xenophagum</i>	75	1e-173
22	12828-14327	1500	Proteína hipotética V473_12660 (KMS55588.1)	<i>Sphingobium czechense LL01</i>	82	0.0
23	14324-15403	1080	Proteína hipotética V473_12665 (KMS55589.1)	<i>Sphingobium czechense LL01</i>	59	4e-125
24	15461-16375	915	Permeasa (WP024018062.1)	<i>Sphingobium sp. C100</i>	94	3e-101
25	16375-17136	762	Proteína hipotética V473_12675 (KMS55591.1)	<i>Sphingobium czechense LL01</i>	95	3e-144
26	17221-18540	1320	Proteína hipotética V473_12680(KMS55592.1)	<i>Sphingobium czechense LL01</i>	89	0.0
27	18737-19819	1083	Glucósido hidrolasa (WP024020355.1)	<i>Sphingobium sp. C100</i>	82	0.0
28	19816-22062	2247	Glucósido hidrolasa (WP024020355.1)	<i>Sphingobium sp. C100</i>	89	0.0
29	22083-22523	441	Proteína hipotética (WP048937636.1)	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	73	4e-35
30	22520-23429	909	Esterasa (WP037520116.1)	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	91	2e-151

Como se puede observar el cuadro 2.7, se encontraron 4 marcos de lectura abiertos de esterases mediante análisis BlastX en el NCBI, esto fue logrado debido a que se obtuvieron todos los posibles marcos de lectura de cada contig en el programa Geneious y a cada secuencia se le realizó un BlastX.

Cuadro 2.7. Marcos de lectura abiertos encontrados en las clonas seleccionadas funcionalmente

Programa	ORF	Longitud (pb)	Similitud	Cobertura Query	Valor E	Identidad
Geneious	EstAS3A	981	Esterasa (<i>Sphingobium xenophagum</i>)	99%	2e-91	83%
ORF Finder y Geneious	EstAS3B	909	Esterasa (<i>Sphingobium yanoikuyae</i>)	97%	2e-151	91%
Geneious	EstAS2	849	Esterasa/lipasa (<i>Sphingobium japonicum</i>)	99%	1e-68	79%
Geneious	EstAS10	804	Esterasa (<i>Sphingobium yanoikuyae</i>)	99%	3e-178	97%

2.2.18 Predicción de péptido señal y dominios transmembranales

Como se puede observar en el cuadro 2.8, el análisis *in silico* predijo que el marco de lectura abierto EstAS3B es de naturaleza extracelular, ya que presenta un péptido señal en la región amino terminal y no presentó dominios alfa y beta transmembranales; los otros marcos de lectura analizados no presentaron péptido señal ni dominios transmembranales. Se tomó la decisión de clonarlos ya que como se mencionó anteriormente, en diversos trabajos se han clonados genes con estas características y en algunos casos han obtenido proteínas extracelulares y recuperado la proteína (Glogauer *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2011; Chow *et al.*, 2012).

Cuadro 2.8. Predicción de Péptido señal, Dominios transmembranales y Peso molecular

ORF	Péptido señal	Dominio transmembranal	Peso molecular (KDa)
EstAS2	NO	NO	29.9
EstAS3A	NO	NO	35.08
EstAS3B	SI	NO	32.1
EstAS10	NO	NO	29.5

Con base en todo lo anterior en este trabajo se decidió subclonar 4 marcos de lecturas abiertos de esterasas en el sistema de expresión aLICator.

2.2.19 Análisis filogenético de EstAS3B

Las secuencias de EstAS3B y proteínas relacionadas fueron alineadas con el algoritmo MAFT en el programa Geneious. En los alineamientos múltiples se identificaron 5 regiones conservadas (motivo I corresponde al agujero oxianion, HGGGF; motivo II corresponde al pentapéptido que alberga la serina catalítica, GDSAG; motivo III DPL, conteniendo el residuo ácido aspártico, motivo IV corresponde a la histidina, la cual se encuentra albergada en el motivo HGF; motivo V, YRLX identificado recientemente por Kim *et al.*, (2015). Se emplearon 16 secuencias de esterasas, de las cuales 6 son secuencias cristalizadas; la secuencia 4Q3K es una esterasa aislada de *Clostridium novyi* NT de un metagenoma a partir de agua de una fosa marina hipersalina del Este del Mar Mediterraneo; 3DNM:A, 1LZL:A, 1EVQ:A, 2C7B:A, 1JJI:A fueron clasificadas por Kourist *et al.*, (2010) como miembros de la familia IV de esterasas y han sido cristalizadas. Las demás secuencias comprenden a AAB89533.1 carboxylesterase (estA, *Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304); AAC38151.1 lipasa (*Pseudomonas sp.* B11-1); AAC41424.1 enzima tipo lipasa (*Cupriavidus necator*); CAA37862.1| Triacilglicerol lipasa (*Moraxella sp.*); WP_020908446.1 esterase (*Rhodococcus erythropolis*); AAC73578.1 acetil esterasa (*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655), KM350209 (secuencia metagenómica reportada por Kim *et al.*, 2015) y 2 secuencias de la familia VII tomadas al azar, Q01470.1 y CAA22794.1

El mejor alineamiento se obtuvo con el algoritmo MAFT de Geneious; se observan claramente que los motivos en la familia IV están conservados, y que hay diferencias claras entre la familia IV y la VII. Se observa que los motivos en EstAS3B muestran mayor similitud

con los motivos de las esterasas de la familia IV que con las esterasas de la familia VII, por lo que parece un miembro de la familia IV (Fig. 2.21).

	I	V	II	III	IV
Consenso	H G G G F	Y R L A	G D S A G	D P L	H G F
Identidad					
EstAS3B	P G G A F	Y R L N	G F S A G	D S L	H G F
4Q3KJA	P G G G Y	Y S V K	G F S A G	D D L	H G L
3DNMJA	H G G G Y	Y R L A	G D S A G	E A L	H V F
1LZLJA	H G G G F	Y R L A	G Q S A G	D P L	H G S
1EVQJA	H G G G W	Y R L A	G D S A G	D P L	H G F
2C7BJA	H G G G F	Y R L A	G D S A G	D P L	H G F
1JJIJC	H G G G F	Y R L A	G D S A G	D P L	H G F
AAB89533.1	H G G G F	Y R L A	G D S A G	D P L	H G F
AAC38151.1	H G G G F	Y R L A	G D S A G	D P L	H G F
AAC41424.1	H G G G F	Y R L G	G D S A G	D P L	H D F
CAA37862.1	H G G G F	Y R M A	G D S A G	D I L	H G F
WP_020908446.1	H G G A Y	Y R L A	G D S A G	E V L	H V A
AAc73578.1	H G G G F	Y T L S	G D S A G	D P L	H A F
KM350209	H G G G W	Y R L A	G E S A G	D P L	H G F
FAMVII-Q01470.1	H G G G L	Y R L G	G Q S G G	A T I	H C I
FAMVII-CAA22794.1	H G G A L	Y R L G	G Q S A G	D V L	H A L

Figura 2.21. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de EstAS3B con proteínas relacionadas de la familia IV y VII. Motivo I corresponde al agujero oxianión; motivo II corresponde al pentapéptido en el cual se encuentra la serina catalítica; motivo III corresponde al residuo ácido; motivo IV corresponde a la histidina catalítica y el motivo V es una nueva secuencia conservada en la familia IV identificada por Kim *et al.*, (2015).

En el árbol se pueden observar los números de acceso con clave PDB, tomados del trabajo de Kourist *et al.*, (2010). Además se agregó la secuencia 4Q3K, la cual comparte motivos estructurales similares a EstAS3B, que fue la que se usó como templatado para obtener la estructura tridimensional de EstAS3B (Fig. 2.22).

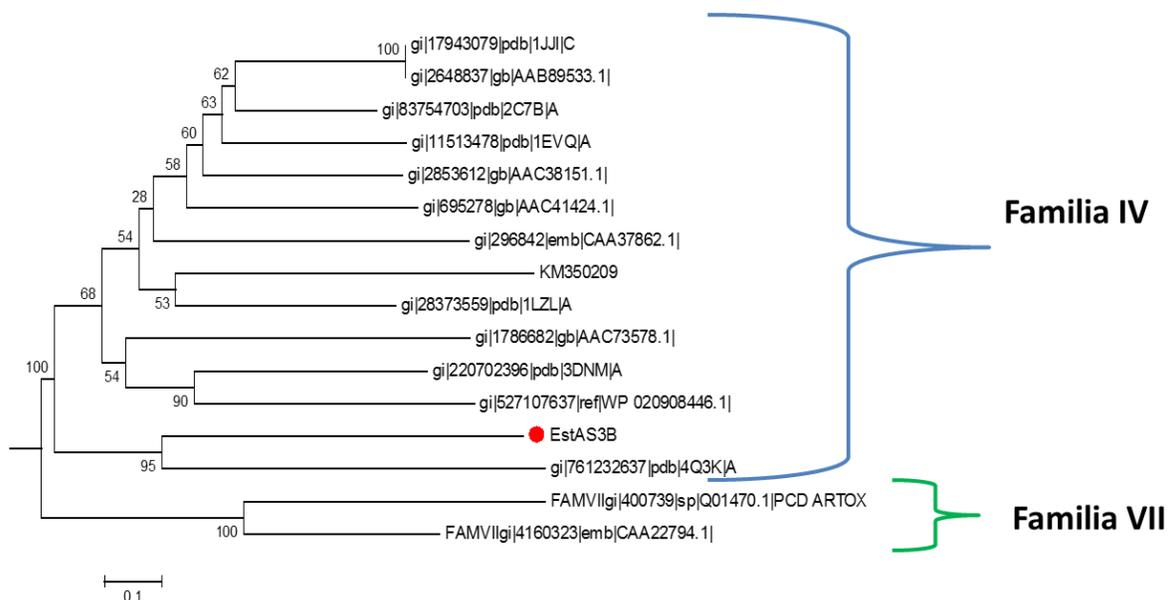


Figura 2.22. Relaciones filogenéticas de proteína EstAS3B con miembros de la familia IV y VII, con las cuales presenta homología. EstAS3B es un nuevo miembro de un clado hermano de la familia IV de esterasas. Árbol obtenido por Neighbor Joining y Bootstrap de 1000. Las distancias evolutivas fueron calculadas empleando el método de corrección de Poisson. El análisis evolutivo fue realizado en MEGA 6.

EstAS3B presenta la triada catalítica serina-aspártico-histidina. Los motivos encontrados en EstAS3B son similares a los que se encuentran en las esterasas de la familia IV pero existen algunas diferencias, como a continuación se describe. La serina nucleofílica se encuentra en el pentapéptido GFSAG (en vez de GDSAG comúnmente encontrado en la familia IV ó GESAG de la familia VII); el residuo ácido albergado en el motivo DSL en vez de DPL comúnmente encontrado en la familia IV ó DEW de la familia VII. La secuencia del oxianión (PGGAF) de EstAS3B diverge un poco del motivo HGGGX encontrados en las familias IV y VII. Únicamente el motivo que alberga a la histidina, HGF, es idéntico al canónico en la familia IV.

En el análisis a detalle de las proteínas que presentan homología con EstAS3B (identificadas en el BLAST en el NCBI usando como query la secuencia de EstAS3B) se observó que presentan el mismo orden de la tríada y exactamente las mismas divergencias

con los motivos de las esterasas de la familia IV. Es decir los motivos de EstAS3B y esas proteínas son idénticos. En el cuadro 12 se observa claramente que las proteínas con códigos de accesoión WP_017503158.1, WP_007708648.1, WP_010338908.1, KMS55596.1 y ETI63162.1 presentan exactamente los mismos aminoácidos en los 5 motivos identificados en EstAS3B. Esas proteínas fueron anotadas como dienolactonas en un proyecto de secuenciación masiva de genomas bacterianos. Los motivos de EstAS3B no son idénticos pero también son similares a los identificados en la esterasa 4Q3K, que fue con la que hizo traslape en la base de datos de proteínas modeladas. El Cuadro 2.9 presenta un resumen de la comparación de motivos de esterasas de las familias IV y VII, de la proteína EstAS3B y de sus homólogos.

Cuadro 2.9. Comparación de motivos importantes en las esterasas EstAS3B, 4Q3K y otras proteínas relacionadas

Esterasa	Pentapéptido conteniendo el nucleófilo catalítico (Serina)	Triada catalítica (orden de aminoácidos)	Motivo que hospeda al residuo acídico (D o E)	Motivo que hospeda la H	Oxianion
Familia IV	GDSAG	S-D-H	DPL	HGF	HGGGF
Familia VII	GESAG	S-D-E	DEW	HTL/HSL/H AL	HGGGX
EstAS3B	GFSAG	S-D-H	DSL	HGF	PGGAF
4Q3K	GFSAG	S-D-H	DDL	HGL	PGGGY
*WP_017503158.1	GFSAG	S-D-H	DSL	HGF	PGGAF
*WP_007708648.1	GFSAG	S-D-H	DSL	HGF	PGGAF
*WP_010338908.1	GFSAG	S-D-H	DSL	HGF	PGGAF
*KMS55596.1	GFSAG	S-D-H	DSL	HGF	PGGAF
*ETI63162.1	GFSAG	S-D-H	DLF	HGF	PGGAF

*Proteínas reportadas en el GenBank a partir de proyectos de secuenciación masiva y anotadas como dienolactonas hidrolasas.

Con el objetivo de demostrar que la proteína EstAS3B es una verdadera esterasa, se realizó un alineamiento empleando secuencias de la familia IV, VII y dienolactonas hidrolasas verdaderas (con función probada). En el alineamiento se observa que las dienolactonas hidrolasas (CAD_28143.1, NP_97009.1, 1DINPDB, AAZ34411.1, ZP_013033464.1, ZP_01107847.1, YP_114241.1, YP_096670.1) no comparten con las esterazas de la familia IV y VII el motivo oxianión I, HGGGX, ni el motivo YRLX, el residuo nucleofílico es Cisteína y no serina como en las familia IV y VII, el residuo ácido y el residuo base histidina no se encuentran en motivos conservados (Fig. 2.23).

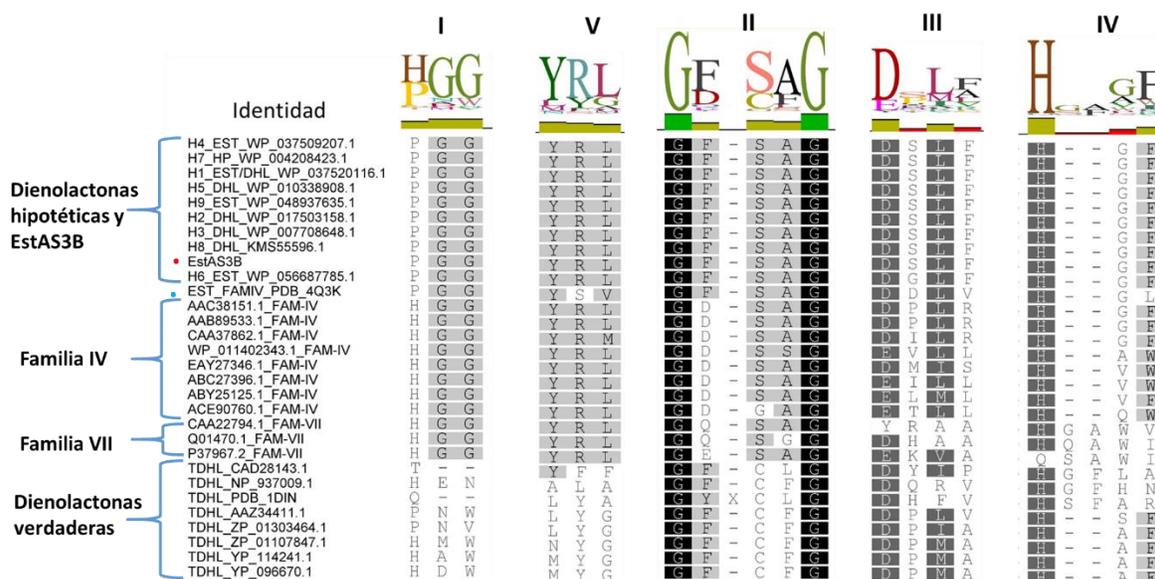


Figura 2.23. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de EstAS3B con proteínas relacionadas de la familia IV y VII y dienolactonas verdaderas.

Con la finalidad de evidenciar que EstAS3B pertenece a nueva familia de esterazas, se realizó un árbol filogenético empleando las 15 familias reportadas por Lee, 2016. En la figura 2.23 se puede observar que la proteína EstAS3B (señalada con punto rojo) forma un nuevo clado cercano a la familia IV y VII, pero se separa de la familia IV. EstAS3B junto con las dienolactonas homólogas en el BLAST del Genbank forman una nueva familia de esterazas y se une a esta familia la proteína con código PDB: 4Q3K, señalada con punto verde (Fig. 2.24).

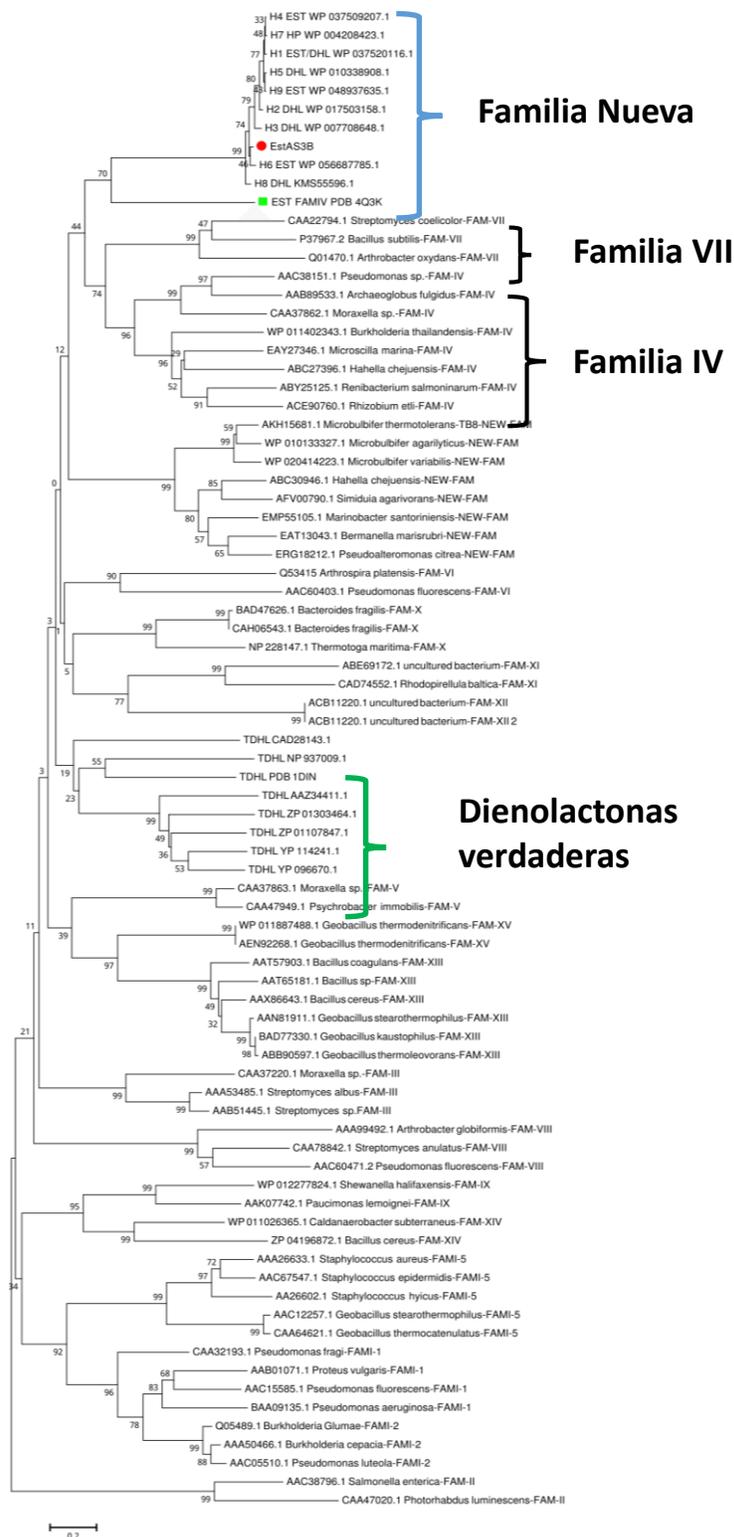


Figura 2.24. Relaciones filogenéticas de proteína EstAS3B con los miembros de las 15 familias de enzimas lipolíticas. EstAS3B junto con las dienolactonas hidrolasas forman un clado cercano a las familias IV y VII. Árbol obtenido por Neighbor Joining y Boostrap de 1000. Las distancias evolutivas fueron calculadas empleando el método de corrección de Poisson. El análisis evolutivo fue realizado en MEGA 6.

2.2.20 Modelamiento molecular de EstAS3B

El modelamiento de EstAS3B fue realizado en el servidor I-Tasser, tomando como templado a MGS-M1 (código PDB: 4Q3K), el cual comparte 25 % de identidad con EstAS3B. El servidor Mustang permitió superponer los 5 modelos arrojados por I-TASSER con la estructura de la esterasa EstAS3B. El modelo seleccionado como el mejor resultó de la superposición de todas las estructuras (Fig. 2.25 A). La superposición reveló que la enzima 4Q3K y EstAS3B son homólogos estructuralmente (Fig. 2.25 B y 2.25 C). El modelamiento de la superficie estructural de EstAS3B muestra un bolsillo catalítico amplio en comparación con la esterasa 4Q3K (Fig. 2.25 D). La predicción del sitio catalítico (Ser188, Asp237, His268) es congruente con los resultados del alineamiento. La estructura de EsAS3B consta de seis alfa hélices enlazadas por ocho láminas betas. En el recuadro de acercamiento se muestra el sitio catalítico de la esterasa, el cual consiste de S188-D237-H268. Las esferas marcadas en naranja (Fig. 2.25 E) muestran los aminoácidos que representan el agujero oxianión, el cual se encuentra cerca del sitio activo.

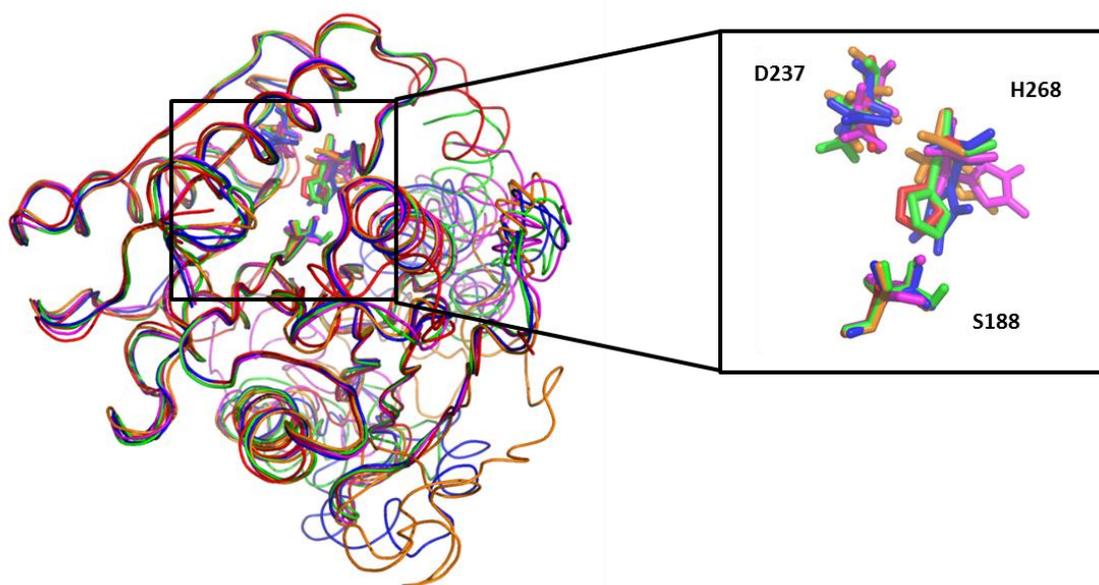


Figura 2.25 A. Superposición de los 5 modelamientos propuestos por el servidor I Tasser para la proteína EstAS3B y sobrepuesto con el modelo del templado (secuencia 4Q3K). El cuadro de acercamiento ("close up") muestra los residuos de la triada catalítica, Ser188, Asp237, His268. El modelamiento de I-TASSER fue abierto con el programa Pymol.

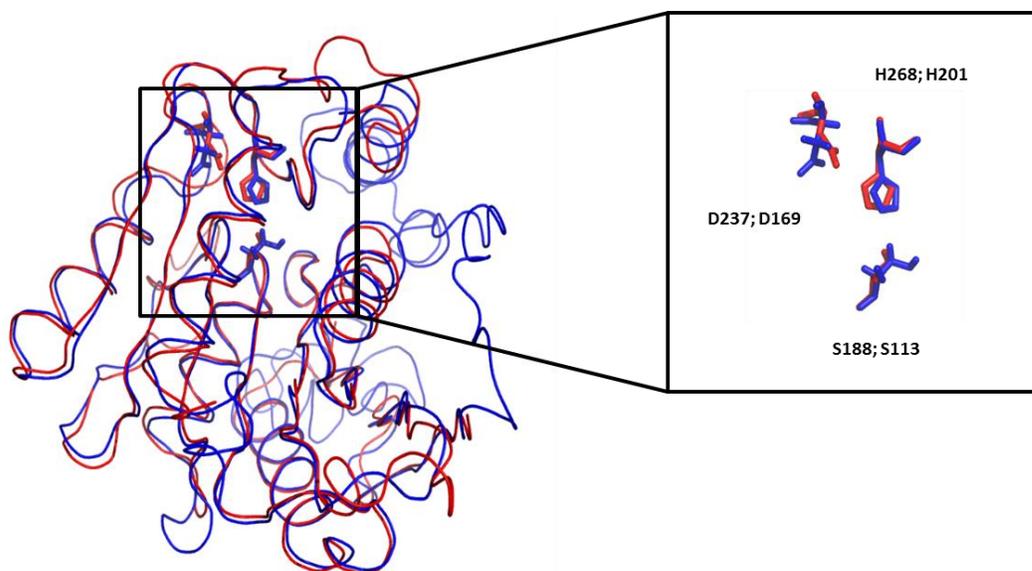


Figura 2.25 B. Representación de EstAS3B (Azul) superpuesta sobre la estructura de la esterasa 4Q3K: A (Rojo). Los residuos catalíticos se encuentran marcados en el recuadro de acercamiento en el cual se indica primero la posición del aminoácido en EstAS3B y luego la posición de ese

aminoácido en 4Q3K: A.

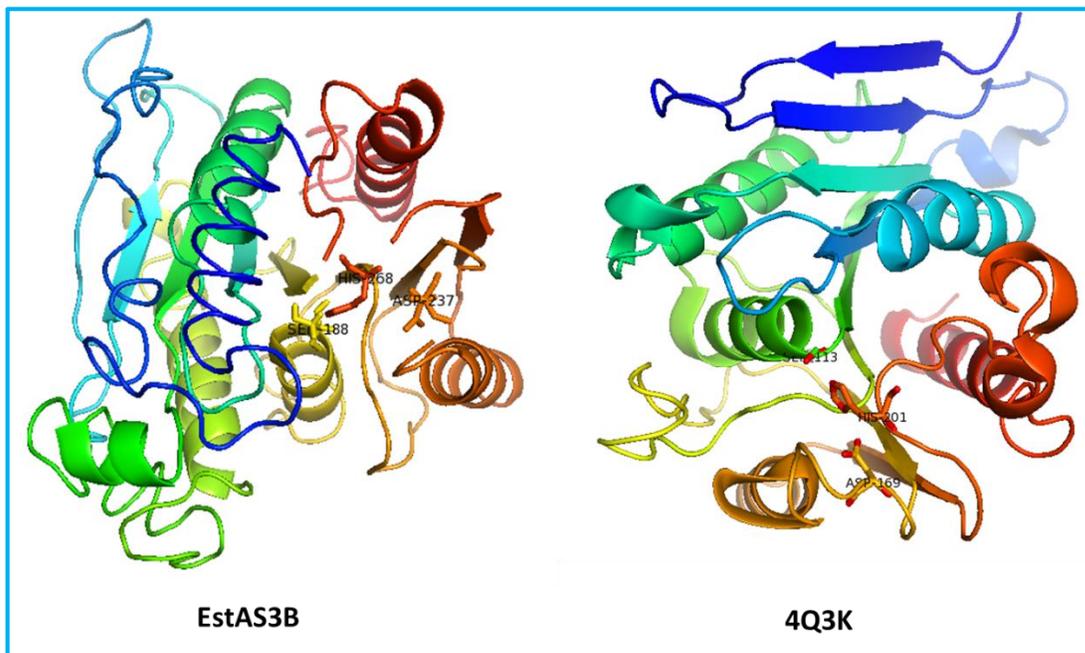


Figura 2.25 C. Análisis del modelamiento con el servidor I-Tasser y visualizado con el software Pymol, mostrando la triada catalítica S188-D237-H268. En el lado derecho se muestra la estructura de la proteína 4Q3K y en el lado izquierdo la posible estructura de la proteína en estudio, revelando la conservación del plegamiento α/β hidrolasa.

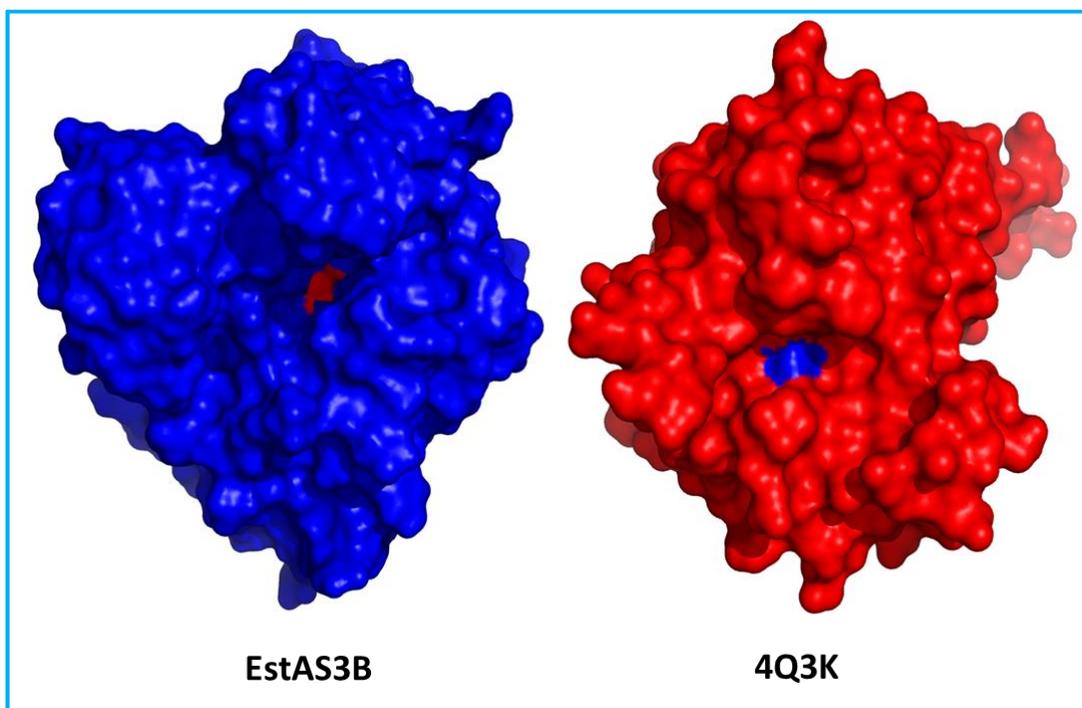


Figura 2.25 D. Comparación de estructuras, mostrando en azul la superficie de EstAS3B, en rojo se muestra la representación de la superficie de la estructura usada como templado (4Q3K). En la figura de la izquierda el rojo resalta el sitio activo (serina catalítica 188) en EstAS3B y en la figura de la derecha el azul resalta el sitio activo (la serina catalítica 113) en 4Q3K.

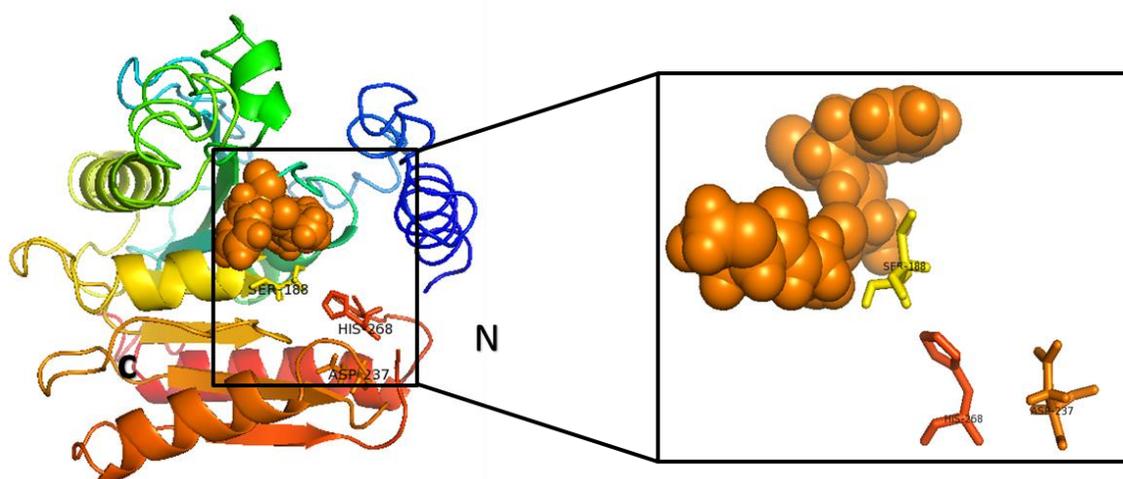


Figura 2.25 E. Representación estructural de la proteína EstAS3B generado por I-Tasser y visualizado con Pymol. Conservación del plegamiento α/β hidrolasa. N, es extremo amino terminal y C, extremo carboxilo terminal. La estructura consta de seis alfa hélices enlazadas por ocho láminas betas. En el recuadro de la derecha se muestra el sitio catalítico conservado de la esterasa, el cual consiste de Ser188-D237-H268. Las esferas marcadas en naranja muestran los aminoácidos que representan el agujero oxianión, el cual se encuentra cerca del sitio activo (como se muestra en el cuadro de acercamiento).

DISCUSIÓN

En este trabajo se clonaron cuatro genes de esterases, pero solo el gen EstAS3B fue expresado de manera activa en el vector de expresión pLATE31 en la cepa *E. coli* BL21 (DE3).

La ausencia de actividad de los otros tres genes puede deberse a varias razones: una posibilidad puede ser que las proteínas se estén quedando como cuerpos de inclusión, tal como se reportó en el trabajo de Fang *et al.*, (2014), es decir que se produzcan en exceso y que no puedan ser activas. Otra posibilidad es el uso diferente de codones entre las bacterias de la que proceden los genes y la bacteria hospedera ya que el reconocimiento de los codones varía entre las mismas cepas de *E. coli* (Sørensen y Mortensen, 2005); en la biblioteca metagenómica donde se obtuvieron resultados positivos en el escrutinio funcional se usó la cepa *E. coli* Epi300, mientras que para la sobreexpresión de las esterases, los constructos en pLATE se hospedaron en la cepa *E. coli* BL21 (DE3), lo cual es poco probable que pudiera ocurrir. También puede ser que la actividad en las clonas metagenómicas se debió a otro ORF en el contig, no identificado bioinformáticamente como esterasa y por lo tanto que no fue subclonado.

La proteína EstAS3B se logró purificar exitosamente por afinidad en una columna de níquel, lo cual se muestra en el análisis de SDS-PAGE; su masa molecular es congruente con la que se predijo en el análisis *in silico* (32 KDa).

Clasificación de EstAS3B

El análisis de alineamiento y de agrupamiento por vecinos cercanos (Neighbor Joining) apoya que EstAS3B es una esterasa.

Cabe mencionar que se decidió seleccionar el resultado del Neighbor Joining entre diferentes análisis; no siempre el mejor árbol filogenético se logra con Máxima Parsimonia o Máxima Verosimilitud. En este caso estos dos últimos se descartaron y se concluyó que el mejor árbol se logró con Neighbor Joining. En otros trabajos sobre esterases se ha descrito que tuvieron la misma experiencia en cuanto a sus análisis filogenéticos (Glogauer *et al.*, 2011; Chow *et al.*, 2012, Selvin *et al.*, 2012; Leis *et al.*, 2015) y se debe a que los

algoritmos de los programas de construcción de árboles evolutivos no pueden resolver bien los miembros de las diferentes familias y agruparlos en clados separados; esto se debe a la alta diversidad que existe entre las esterasas. Esto lleva a que los miembros de las diferentes familias se mezclen y no se resuelvan en clados discretos.

Neighbor Joining logró agrupar correctamente las familias y esto se concluyó porque se usaron secuencias ya reportadas (la mayoría de las secuencias de proteínas incluidas en la construcción del árbol filogenético ya fueron cristalizadas) y se logró un alineamiento congruente de los motivos funcionales reportados y el árbol Neighbor Joining coincide con el agrupamiento reportado para esas secuencias. Esto se consideró como la validación del árbol filogenético.

EstAS3B agrupó cerca de la familia IV, lo cual es consistente con el resultado de su modelamiento y la presencia de los motivos característicos catalíticos de esta familia: el motivo pentapéptido conteniendo el nucleófilo catalítico (GX SXG), el dominio consenso GDSAG; en EstAS3B hay un cambio en este dominio, en vez de D (Asp) se encuentra una F (Fen). El residuo ácido de la triada catalítica, generalmente D (Asp), en DPL cambia a DSL en EstAS3B pero algunos miembros de la familia IV muestran este mismo cambio. El motivo HGF de EstAS3B también es un motivo típico de la familia IV.

En la construcción de los árboles filogenéticos con máxima Parsimonia se observó que algunos árboles agrupan a EstAS3B en la familia VII, pero esto se descartó porque presenta más similitud con los motivos de las esterasas de la familia IV que de la VII y porque todos los miembros de la familia VII son proteínas mayores de 50 KDa; EstAS3B (32 KDa) es pequeña como todas las esterasas de la familia IV. Los miembros de la familia VII presentan secuencias de alrededor de 500 aminoácidos, mientras que en la familia IV son de aproximadamente 300 aminoácidos. La familia VII de esterasas comparte algunas características con las esterasas de la familia IV: ambas poseen el mismo orden en los aminoácidos de la triada catalítica (Serina catalítica, residuo ácido y residuo histidina). Ambas comparten similitud en el agujero del oxianion (HGG) y la presencia del motivo YRLX identificado recientemente por Kim *et al*, (2015). Estas características en común pueden explicar porqué algunos árboles mezclan miembros de las familias IV y VII, como fue el caso

de quedar EstAS3B agrupada en la familia VII en la filogenia por Parsimonia.

Además de la diferencia en tamaño entre las esterasas de las familias IV y VII se pueden mencionar otras diferencias. El residuo ácido de la triada es generalmente ácido glutámico (E) (en DEW) en la familia VII mientras en las IV es aspártico (D) en DPL. La histidina de la triada catalítica está típicamente en el motivo HGF en la familia IV mientras que en la familia VII no se alberga en un motivo conservado (los aminoácidos flanquantes varían).

La observación detallada del árbol revela que forma un clado hermano con la familia IV pero no se integra completamente a su grupo, lo que sugiere que está emparentada con esta familia pero ó es una nueva subfamilia de ésta o se trata de una nueva familia de esterasas. El primer hit en el BLAST en la base de datos del NCBI reportó homología con una esterasa de *Sphingobium yanoikuyae* pero curiosamente el segundo hit reportó con una supuesta dienolactona hidrolasa, sin embargo, como se ha explicado, los análisis bioinformáticos, análisis de escrutinio funcional y caracterización bioquímica sobre ésteres de ácidos grasos indican que EstAS3B es una esterasa. Otros genes homólogos a EstAS3B en el BLAST con la base de datos del GenBank fueron también predichos como dienolactonas hidrolasas, estos genes no se han caracterizado, por lo tanto, no se cuenta con información estructural ni funcional (se revisaron las primeras 5 secuencias).

Las dienolactonas hidrolasas catalizan la hidrólisis de dienolactona a maleilacetato y participan en la degradación de compuestos cloroaromáticos; también tienen actividad de carboxilestera. Las dienolactonas hidrolasas tienen una triada catalítica Cys-His-Asp mientras que las encontradas en el GenBank con homología con EstAS3B tienen Ser-Asp-His (como EstAS3B). La secuencia alrededor del nucleófilo (Cys) en las dienolactonas hidrolasas es Sm-X-Nu-Sm-Sm donde Sm= es cualquier aminoácido pequeño y Nu es residuo nucleófilo Cisteína (Kim *et al.*, 2015; Moiseeva *et al.*, 2002; Hollender *et al.*, 1997). Este motivo muestra algo de similitud con el pentapéptido GFSAG de las esterasas, pues glicina y alanina son aminoácidos pequeños alrededor del nucleófilo, que en el caso de las esterasas es serina. En el análisis detallado de sus secuencias se encontró que esas proteínas presentan los mismos motivos I, II, III, IV y V que EstAS3B (Motivo oxianion PGGAF; residuo nucleófilo serina albergado en el pentapéptido GFSAG; residuo ácido Asp (D) albergado en el motivo DSL; residuo Histidina (H) albergado en el motivo

conservado HGF, y motivo YRLX).

Esas proteínas hipotéticas no han sido caracterizadas, por lo tanto, su función no ha sido demostrada, ya que se derivan de un proyecto de secuenciación y anotación masiva. Esas proteínas presentan alrededor de 90 % de identidad con EstAS3B y en el análisis de sus secuencias se identificaron todos los motivos característicos de las esterasas, incluyendo el motivo catalítico. Con base en los análisis bioinformáticos en este trabajo se sugiere que se trata de esterasas y que pertenecen a la misma familia que EstAS3B. La búsqueda en la base de datos de proteínas (Data Bank Protein, PDB) para encontrar el modelo para EstAS3B arrojó como primer hit a la enzima 4Q3K, la cual es una esterasa verdadera. La proteína EstAS3B y la 4Q3K poseen un dominio oxianion PGGAF y PGGGY respectivamente, que se separan del canónico HGGGF de la familia IV. Nuestra propuesta es que EstAS3B, 4Q3K, WP_017503158.1, WP_007708648.1, WP_010338908.1, KMS55596.1 y ETI63162.1 conforman una nueva familia de esterasas o una subfamilia de la familia IV. Estas supuestas dienolactonas se derivan de un proyecto de referencia para el proyecto del microbioma humano, el origen de la colección de cepas es muy amplio, no se describe de donde se obtuvieron estos genomas.

Características de EstAS3B

La esterasa EstAS3B presenta parámetros cinéticos interesantes. Para poder medirla *in vitro* se tuvo que usar 40 ng de la proteína pura mientras que en otros trabajos (Privé *et al.*, 2015, Fu *et al.*, 2010, Tchigvintsev *et al.*, 2015,) usaron 0.4 mg, 0.1 µg, 0.1 µg lo cual es entre 2.5 (en el caso de 0.1 µg) hasta 10,000 (en el caso de 0.4mg) veces más de lo que se usó en los ensayos del presente trabajo. La enzima mostro una Km de 0.13 mM. Algunas esterasas reportadas muestran un Km inferior a EstAS3B. Por ejemplo, Rao *et al.*, (2013) reportaron una esterasa con una Km de 0.09 mM; Sriyapai *et al.*, (2015) reportaron una esterasa con una Km de 0.02 mM; Oh *et al.*, (2012) reportaron una Km de 0.07 mM. EstAS3B muestra una Km similar a las reportadas por Tirawongsaroj *et al.*, (2008); Rodríguez *et al.*, (2015); Pereira *et al.*, (2015), que reportaron kms de 0.1 mM, 0.16 mM y 0.22 mM respectivamente. Otros trabajos reportan kms superiores a la de EstAS3B: Park *et al.*, (2006); Tekincanli *et al.*, (2015); Brault *et al.*, (2012); Rashamuse *et al.* (2009); Oh *et al.* (2012) reportaron esterasas con Kms de 0.85 mM, 4.2 mM, 0.84 mM, 1.5 mM, y 0.9 mM

respectivamente. Es decir aunque hay algunas esterasas con mayor afinidad por el sustrato, EstAS3B presenta una afinidad superior a la de la mayoría de las esterasas reportadas. Cabe mencionar que esterasa EstAS3B presenta los parámetros cinéticos de k_m en los órdenes de magnitud de las enzimas usadas de manera comercial, los cuales van de 10^{-1} a 10^{-5} M (Fullbrook, 1996, Bar-Even *et al.*, 2011) por lo que esterasa EstAS3B tiene potencial industrial.

La enzima fue estable 20-50 °C después de 30 minutos de incubación en cada temperatura; su actividad cae después de incubar 30 minutos a 60°C, similar a otras reportadas. Su temperatura óptima fue de 40 °C, similar a otras reportadas (Peng *et al.*, 2011; Rodriguez *et al.*, 2015; Rashamuse *et al.*, 2009). Algunas esterasas son estables a 60 °C pero estas enzimas fueron aisladas de microorganismos termófilos (Leis *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2015) lo que puede explicar su termoestabilidad, mientras la esterasa EstAS3B se aisló de una fuente mesófila. Sin embargo, la mayoría de los procesos industriales que emplean esterasas requieren temperaturas de reacción de alrededor de los 45 °C (Haki y Rakshit, 2003), por lo que la enzima tiene potencial industrial, ya que mantiene 80 % de su actividad a esta temperatura.

La esterasa EstAS3B no actúa a pH ácido y su óptimo es 7.5, similar a otras reportadas (Fu *et al.*, 2011; Jeon *et al.*, 2009; Jian *et al.*, 2012), lo cual pueda explicarse porque presenta péptido señal que indica que es una esterasa secretada al exterior de la bacteria y las aguas de Yucatán, medio ambiente donde tendría que actuar, son alcalinas.

La preferencia por ácidos grasos de cadena corta (<10 carbonos) e incapacidad de actuar sobre ácidos grasos de cadena larga (>12 carbonos) apoya que EstAS3B es una verdadera esterasa. Actualmente el uso de las esterasas está en crecimiento en el mercado mundial de enzimas industriales. En la industria alimentaria se ha usado para la modificación de sabores (eliminación de sabores no deseados como rancidez); en la industria papelera para la remoción de sustancias pegajosas de la pulpa del papel; como aditivos en detergentes; para la síntesis de componentes enantiopuros en la industria farmacéutica (antibióticos, anti-inflamatorios como ibuprofeno, ketoprofeno, etc.). Otro uso importante de las esterasas es en la biorremediación (Bornscheuer, 2002; Jaeger and Eggert, 2002, Joseph *et al.*, 2007; López *et al.*, 2014).

El orden de aminoácidos en el oxianión de EstAS3B (PGGAF), dos glicinas seguido por una alanina, es un tipo de oxianion que está presente en esterasas que actúan sobre alcoholes terciarios (Bassegoda *et al*, 2013; Bassegoda *et al*, 2010; Henke *et al* 2002, 2003; Kourist *et al*, 2008). Las funciones biológicas de las esterasas que actúan sobre alcoholes terciarios son desconocidas; Ferreira *et al.*, (2006); François (2003), propusieron que estas esterasas pueden participar en algunas vías de degradación metabólicas, por ejemplo la hidrólisis de ésteres terciarios derivados de la degradación metabólica de metil ter-butil éter. En la industria estas esterasas son usadas en la transformación de alcoholes terciarios enantiopuros, para la “construcción de bloques moleculares” en reacciones de síntesis orgánica de fármacos (Hasan *et al.*, 2006; Jaeger and Eggert 2002, José *et al.*, 2015), lo que hace de esta nueva esterasa una enzima de interés en la industria farmacéutica.

El gen de esterasa EstAS3B probablemente proviene del genero *Sphingobium* ya que él mismo y varios de los genes identificados en el inserto del Fósido 3 presentan homología con genes de bacterias del género *Sphingobium*. Cabe mencionar que el género *Sphingobium* pertenece a la clase alfa proteobacteria y se agrupa dentro de la familia *Sphingomonadaceae*. Los miembros de esta familia se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y son conocidos por degradar una gran variedad de componentes (Lal *et al.*, 2008). Se han identificado 25 especies, aisladas principalmente de suelos contaminados y lodos residuales; sus principales funciones se han atribuido a la biorremediación y biodegradación de contaminantes como hexaclorociclohexano y otros compuestos xenobióticos. Todas las especies de este género de bacterias son estrictamente aeróbicas, Gram negativas y quimiotróficas, muchas cepas han sido identificadas y cultivadas por métodos tradicionales (Basta *et al.*, 2005; Bala *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). La presencia de estas bacterias en las aguas del Acuífero de Yucatán sugiere esas bacterias pueden prosperar en estas aguas aprovechando sus minerales mediante su metabolismo quimiotrófico.

Proteína EstAS3B

La esterasa EstAS3B presenta un péptido señal que comprende los primeros 18 aminoácidos Met1–Ala18, lo cual sugería que es secretada al espacio extracelular y explica que se haya identificado en una clona metagenómica mediante halo de hidrólisis en un

medio de cultivo sólido conteniendo tributirina. Sin embargo, en la sobreexpresión heteróloga de la proteína en medio líquido no pudo detectarse en el medio extracelular. Una posibilidad es que la proteína puede ser secretada del huésped original, pero no cuando es expresada de manera heteróloga en la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* (Sørensen and Mortensen, 2005; Villegas y Kropinski, 2008; Warren *et al.*, 2008; Kellner *et al.*, 2011), mientras que la cepa EPI300 de *E. coli*, que tiene otro fondo genético, si fue capaz de secretar a la proteína. Długołęcka *et al.*, 2008 reportaron una esterasa que obedece al sistema de secreción del transportador ABC, en el caso de EStAS3B es poco probable que esta situación se presente debido a que este gen no presenta dominios transmembranales, ni los genes que se encuentran alrededor de él. Los resultados sugirieron que la proteína quedó retenida en el citoplasma o en el periplasma, por lo cual no fue eficientemente secretada al exterior. Esto pudo deberse al incorrecto reconocimiento del péptido señal por parte de *E. coli* BL21 (DE3). Una alternativa para solucionar este problema es utilizar un péptido señal que provenga de *E. coli* o un vector que incluya un péptido señal con función probada en sistemas de expresión heteróloga en *E. coli*.

El porcentaje de éxito reportado en la literatura para la identificación de esterases en bibliotecas metagenómicas de fósmidos ha sido de 0.01 a 0.5 % (Uchiyama *et al.*, 2009), similar a lo que se obtuvo en este trabajo (0.04 %), lo que apoya que la biblioteca metagenómica construida en el CICY fue correctamente elaborada, con una buena representación de metagenoma y también el escrutinio de esterases fue adecuado.

En resumen, se identificó una nueva esterasa, miembro de una posiblemente nueva familia, cercana a la familia IV, que posee parámetros cinéticos atractivos para la industria. De confirmarse que es capaz de actuar sobre alcoholes terciarios, la enzima tendría un nicho de aplicación en la síntesis de fármacos. Su estabilidad en presencia de disolventes orgánicos, iones, cationes especialmente alcoholes, debe evaluarse también.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES

Se logró el escrutinio funcional de esterases. El porcentaje de clonas positivas identificadas en la biblioteca metagenómica es similar a lo reportado en otros trabajos.

Se logró la expresión heteróloga de la proteína EstAS3B y se confirmó que es una verdadera esterasa.

EstAS3B es una esterasa nueva, procedente posiblemente de una bacteria del género *Sphingobium*.

Los análisis de alineamientos múltiples, modelamiento y filogenia apoyan que EstAS3B pertenece a una nueva clase o subclase de esterases, la cual comprende a esta proteína, a la proteína 4Q3K y a proteínas reportadas en el GenBank como supuestas dienolactonas hidrolasas.

Con base en los análisis de motivos estructurales y a la filogenia, se rebate la anotación de dienolactonas hidrolasas para las proteínas con números de accesoión WP_017503158.1, WP_007708648.1, WP_010338908.1, KMS55596.1 y ETI63162.1 en el GenBank y se propone que estas corresponden a esterases verdaderas.

La esterasa EstAS3B posee parámetros cinéticos comparables a las enzimas usadas actualmente en aplicaciones industriales

El modelamiento de EstAS3B muestra un bolsillo catalítico amplio. Este dato junto con la secuencia encontrada para el oxianión, sugieren que esta esterasa pueda actuar sobre alcoholes terciarios, reacción de gran importancia en la industria farmacéutica.

PERSPECTIVAS

Evaluar la estabilidad enzimática de EstAS3B ante disolventes y metales.

Evaluar la actividad en alcoholes terciarios.

Explorar sus potenciales usos en la industria alimentaria, papelera, energética, biorremediadora y farmacéutica.

REFERENCIAS

- Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1), 117-139.
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(12), 5301-5317.
- 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.
- Anbu, P., Gopinath, S. C., Chaulagain, B. P., Tang, T. H., & Citartan, M. (2015). Microbial enzymes and their applications in industries and medicine 2014. *Biomed Res Int*, 2015, 816419.
- Arpigny, J. L., & Jaeger, K. E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal*, 343(1), 177-183.
- Ausubel, F. M. (2007). *Current protocols in molecular biology: volume 2*. John Wiley & Sons.
- Babu, I. S., & Rao, G. H. (2007). Optimization of process parameters for the production of lipase in submerged fermentation by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Res J Microbiol*, 2, 88-93.
- Bala, K., Sharma, P., & Lal, R. (2010). *Sphingobium quisquiliarum* sp. nov., a hexachlorocyclohexane (HCH)-degrading bacterium isolated from an HCH-contaminated soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(2), 429-433.
- Bar-Even, A., Noor, E., Savir, Y., Liebermeister, W., Davidi, D., Tawfik, D. S., & Milo, R. (2011). The moderately efficient enzyme: evolutionary and physicochemical trends shaping enzyme parameters. *Biochemistry*, 50(21), 4402-4410.

- Barone, R., De Santi, C., Palma Esposito, F., Tedesco, P., Galati, F., Visone, M. & De Pascale, D. (2014). Marine metagenomics, a valuable tool for enzymes and bioactive compounds discovery. *Frontiers in Marine Science*, 1, 38.
- Bassegoda, A., Fillat, A., Pastor, F. J., & Diaz, P. (2013). Special Rhodococcus sp. CR-53 esterase Est4 contains a GGG (A) X-oxyanion hole conferring activity for the kinetic resolution of tertiary alcohols. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(19), 8559-8568.
- Bassegoda, A., Nguyen, G. S., Schmidt, M., Kourist, R., Diaz, P., & Bornscheuer, U. T. (2010). Rational protein design of *Paenibacillus barcinonensis* esterase EstA for kinetic resolution of tertiary alcohols. *ChemCatChem*, 2(8), 962-967.
- Basta, T., Buerger, S., & Stolz, A. (2005). Structural and replicative diversity of large plasmids from *sphingomonads* that degrade polycyclic aromatic compounds and xenobiotics. *Microbiology*, 151(6), 2025-2037.
- Beisson, F., Arondel, V., & Verger, R. (2000). Assaying Arabidopsis lipase activity. *Biochemical Society Transactions*, 28(6), 773-775.
- Beloqui, A., de María, P. D., Golyshin, P. N., & Ferrer, M. (2008). Recent trends in industrial microbiology. *Current opinion in microbiology*, 11(3), 240-248.
- Benjamin, S., & Pandey, A. (1998). *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast*, 14(12), 1069-1087.
- Bornscheuer, U. T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS microbiology reviews*, 26(1), 73-81.
- Bornscheuer, U. T., & Kazlauskas, R. J. (2006). *Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations*. John Wiley & Sons.
- Brault, G., Shareck, F., Hurtubise, Y., Lépine, F., & Doucet, N. (2012). Isolation and

- characterization of EstC, a new cold-active esterase from *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *PLoS One*, 7(3), e32041.
- Choi, Y. J., & Lee, B. (2001). Culture conditions for the production of esterase from *Lactobacillus casei* CL96. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 24(1), 59-63.
- Chow, J., Kovacic, F., Antonia, Y. D., Krauss, U., Fersini, F., Schmeisser, C., Menyes, I. (2012). The metagenome-derived enzymes LipS and LipT increase the diversity of known lipases. *PLoS One*, 7(10), e47665.
- Chung, G. H., Lee, Y. P., Jeohn, G. H., Yoo, O. J., & Rhee, J. S. (1991). Cloning and nucleotide sequence of thermostable lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. *Agricultural and biological chemistry*, 55(9), 2359-2365.
- De Santi, C., Ambrosino, L., Tedesco, P., de Pascale, D., Zhai, L., Zhou, C. & Ma, Y. (2015). Identification and characterization of a novel salt-tolerant esterase from a Tibetan glacier metagenomic library. *Biotechnology progress*, 31(4), 890-899
- Degrassi G, Devescovi G, Kim J, Hwang I, Venturi V. (2008) Identification, characterization and regulation of two secreted polygalacturonases of the emerging rice pathogen *Burkholderia glumae*. *FEMS Microbiol Ecol* 65(2): 251–262.
- Demain, A. L., & Adrio, J. L. (2008). Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular Biotechnology*, 38(1), 41-55.
- Devescovi G, Bigirimana J, Degrassi G, Cabrio L, LiPuma JJ, Kim J, Hwang I, Venturi V (2007) Involvement of a quorum-sensing-regulated lipase secreted by a clinical isolate of *Burkholderia glumae* in severe disease symptoms in rice. *Appl Environ Microbiol* 73: 4950–4958.
- Divakar, S., & Manohar, B. (2007). Use of lipases in the industrial production of esters. In *Industrial Enzymes* (pp. 283-300). Springer Netherlands.
- Długolecka, A., Cieśliński, H., Bruździak, P., Gottfried, K., Turkiewicz, M., & Kur, J. (2008).

-
- Purification and biochemical characteristic of a cold-active recombinant esterase from *Pseudoalteromonas* sp. 643A under denaturing conditions. Polish journal of microbiology/Polskie Towarzystwo Mikrobiologow= The Polish Society of Microbiologists, 58(3), 211-218.
- Długolecka, A., Cieśliński, H., Turkiewicz, M., Białkowska, A. M., & Kur, J. (2008). Extracellular secretion of *Pseudoalteromonas* sp. cold-adapted esterase in *Escherichia coli* in the presence of *Pseudoalteromonas* sp. components of ABC transport system. Protein expression and purification, 62(2), 179-184.
- Dutta, S., & Ray, L. (2009). Production and characterization of an alkaline thermostable crude lipase from an isolated strain of *Bacillus cereus* C7. Applied biochemistry and biotechnology, 159(1), 142-154.
- Eschenfeldt, W. H., Maltseva, N., Stols, L., Donnelly, M. I., Gu, M., Nocek, B. & Joachimiak, A. (2010). Cleavable C-terminal His-tag vectors for structure determination. Journal of structural and functional genomics, 11(1), 31-39.
- Fan, X., Niehus, X., & Sandoval, G. (2012). Lipases as biocatalyst for biodiesel production. Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols, 471-483.
- Fang, Z., Li, J., Wang, Q., Fang, W., Peng, H., Zhang, X., & Xiao, Y. (2014). A novel esterase from a marine metagenomic library exhibiting salt tolerance ability. J Microbiol Biotech, 24, 771-780.
- Fernández, J., Mohedano, A. F., Fernández-García, E., Medina, M., & Nuñez, M. (2004). Purification and characterization of an extracellular tributyrin esterase produced by a cheese isolate, *Micrococcus* sp. INIA 528. International dairy journal, 14(2), 135-142.
- Ferreira, N. L., Maciel, H., Mathis, H., Monot, F., Fayolle-Guichard, F., & Greer, C. W. (2006). Isolation and characterization of a new *Mycobacterium austroafricanum* strain, IFP 2015, growing on MTBE. Applied microbiology and biotechnology, 70(3), 358-365.

-
- Ferrer M, Martí'nez-Abarca F, Golyshin P (2005) Mining genomes and 'metagenomes' for novel catalysts. *Curr Opin Biotechnol* 16:588–593
- Ferrer, M., Beloqui, A., Timmis, K. N., & Golyshin, P. N. (2009). Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 16(1-2), 109-123.
- Ferrer, P., Montesinos, J. L., Valero, F., & Solà, C. (2001). Production of native and recombinant lipases by *Candida rugosa*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 95(3), 221-255.
- Fillat, A., Romea, P., Urpí, F., Pastor, F. J., & Diaz, P. (2014). Improving enantioselectivity towards tertiary alcohols using mutants of *Bacillus* sp. BP-7 esterase EstBP7 holding a rare GGG (X)-oxyanion hole. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(10), 4479-4490.
- François, A., Garnier, L., Mathis, H., Fayolle, F., & Monot, F. (2003). Roles of tert-butyl formate, tert-butyl alcohol and acetone in the regulation of methyl tert-butyl ether degradation by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. *Applied microbiology and biotechnology*, 62(2-3), 256-262.
- Fromme, T., & Klingenspor, M. (2007). Rapid single step subcloning procedure by combined action of type II and type IIs endonucleases with ligase. *Journal of biological engineering*, 1(1), 1.
- Fu, C., Hu, Y., Xie, F., Guo, H., Ashforth, E. J., Polyak, S. W. & Zhang, L. (2011). Molecular cloning and characterization of a new cold-active esterase from a deep-sea metagenomic library. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(3), 961-970.
- Fullbrook PD. Practical applied kinetics. In: Godfrey T, West S, editors. *Industrial enzymology*. 2nd ed. New York: Stockton Press, 1996. pp. 483 – 540.
- Gamboa-Angulo, M., De la Rosa-Garcia, S. C., Heredia-Abarca, G., & Medina-Baizabal, I. (2012). Antimicrobial screening of tropical microfungi isolated from sinkholes

-
- located in the Yucatan peninsula, Mexico. *African Journal of Microbiology Research*, 6(10), 2305-2312.
- Gilham, D., & Lehner, R. (2005). Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*, 36(2), 139-147.
- Glogauer, A., Martini, V. P., Faoro, H., Couto, G. H., Müller-Santos, M., Monteiro, R. A., & Krieger, N. (2011). Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 1.
- Glueck, S. M., Gümüs, S., Fabian, W. M., & Faber, K. (2010). Biocatalytic carboxylation. *Chemical Society Reviews*, 39(1), 313-328.
- Godinho, L. F., Reis, C. R., Tepper, P. G., Poelarends, G. J., & Quax, W. J. (2011). Discovery of an *Escherichia coli* esterase with high activity and enantioselectivity toward 1, 2-O-isopropylidenglycerol esters. *Applied and environmental microbiology*, 77(17), 6094-6099.
- Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied microbiology and biotechnology*, 64(6), 763-781.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed research international*, 2013.
- Haki, G. D., & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource technology*, 89(1), 17-34.
- Handelsman, J. (2007). *Metagenomics and microbial communities*. eLS.
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & biology*, 5(10), R245-R249.
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial

-
- lipases. *Enzyme and Microbial technology*, 39(2), 235-251.
- Henke, E., Pleiss, J., & Bornscheuer, U. T. (2002). Activity of lipases and esterases towards tertiary alcohols: insights into structure–function relationships. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(17), 3211-3213.
- Heurlier, K., Williams, F., Heeb, S., Dormond, C., Pessi, G., Singer, D. & Haas, D. (2004). Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology*, 186(10), 2936-2945.
- Hollender, J., Hopp, J., & Dott, W. (1997). Degradation of 4-Chlorophenol via the meta Cleavage Pathway by *Comamonas testosteroni* JH5. *Applied and environmental microbiology*, 63(11), 4567-4572.
- Holmberg, M. A., Gowda, N. K. C., & Andréasson, C. (2014). A versatile bacterial expression vector designed for single-step cloning of multiple DNA fragments using homologous recombination. *Protein expression and purification*, 98, 38-45.
- Holmquist, M. (2000). Alpha beta-hydrolase fold enzymes structures, functions and mechanisms. *Current Protein and Peptide Science*, 1(2), 209-235.
- Holton, T. A., & Graham, M. W. (1991). A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Research*, 19(5), 1156.
- Hu, Y., Liu, Y., Li, J., Feng, Y., Lu, N., Zhu, B., & Xue, S. (2015). Structural and functional analysis of a low-temperature-active alkaline esterase from South China Sea marine sediment microbial metagenomic library. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 42(11), 1449-1461.
- Jaeger, K. E., & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current opinion in Biotechnology*, 13(4), 390-397.
- Jaeger, K. E., & Reetz, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in biotechnology*, 16(9), 396-403.

-
- Jegannathan, K. R., & Nielsen, P. H. (2013). Environmental assessment of enzyme use in industrial production—a literature review. *Journal of cleaner production*, 42, 228-240.
- Jeon, J. H., Kim, J. T., Kang, S. G., Lee, J. H., & Kim, S. J. (2009). Characterization and its potential application of two esterases derived from the arctic sediment metagenome. *Marine biotechnology*, 11(3), 307-316.
- Jiang, X., Xu, X., Huo, Y., Wu, Y., Zhu, X., Zhang, X., & Wu, M. (2012). Identification and characterization of novel esterases from a deep-sea sediment metagenome. *Archives of microbiology*, 194(3), 207-214.
- Jochens, H., Hesseler, M., Stiba, K., Padhi, S. K., Kazlauskas, R. J., & Bornscheuer, U. T. (2011). Protein Engineering of α/β -Hydrolase Fold Enzymes. *ChemBioChem*, 12(10), 1508-1517.
- José, C., Toledo, M. V., & Briand, L. E. (2015). Enzymatic kinetic resolution of racemic ibuprofen: past, present and future. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1-13.
- Joseph, B., Ramteke, P. W., Thomas, G., & Shrivastava, N. (2007). Standard review cold-active microbial lipases: a versatile tool for industrial applications. *Biotechnol Mol Biol Rev*, 2(2), 39-48.
- Kang, C. H., Oh, K. H., Lee, M. H., Oh, T. K., Kim, B. H., & Yoon, J. H. (2011). A novel family VII esterase with industrial potential from compost metagenomic library. *Microbial cell factories*, 10(1), 1.
- Kapoor, M., & Gupta, M. N. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, 47(4), 555-569.
- Kellner, H., Luis, P., Portetelle, D. & Vandenberg, M. (2011). Screening of a soil metatranscriptomic library by functional complementation of *Saccharomyces cerevisiae* mutants. *Microbiological research*, 166(5), 360-368.
- Khan, M., & Jithesh, 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, H. J., Jeong, Y. S., Jung, W. K., Kim, S. K., Lee, H. W., Kahng, H. Y. & Kim, H. (2015). Characterization of Novel Family IV Esterase and Family I. 3 Lipase from an Oil-Polluted Mud Flat Metagenome. *Molecular biotechnology*, 57(9), 781-792.
- Kim, G. J., Choi, G. S., Kim, J. Y., Lee, J. B., Jo, D. H., & Ryu, Y. W. (2002). Screening, production and properties of a stereospecific esterase from *Pseudomonas* sp. S34 with high selectivity to (S)-ketoprofen ethyl ester. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17(1), 29-38.
- Kim, H. K., Liu, J. W., Carr, P. D., & Ollis, D. L. (2005). Following directed evolution with crystallography: structural changes observed in changing the substrate specificity of diene lactone hydrolase. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 61(7), 920-931.
- Kim, H. K., Na, H. S., Park, M. S., Oh, T. K., & Lee, T. S. (2004). Occurrence of ofloxacin ester-hydrolyzing esterase from *Bacillus niacini* EM001. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 27(4), 237-241.
- Kim, Y. H., Cha, C. J., & Cerniglia, C. E. (2002). Purification and characterization of an erythromycin esterase from an erythromycin-resistant *Pseudomonas* sp. *FEMS microbiology letters*, 210(2), 239-244.
- Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current opinion in biotechnology*, 13(4), 345-351.
- Kourist, R., Dominguez de Maria, P., & Bornscheuer, U. T. (2008). Enzymatic synthesis of optically active tertiary alcohols: expanding the biocatalysis toolbox. *ChemBioChem*, 9(4), 491-498.
- Kourist, R., Jochens, H., Bartsch, S., Kuipers, R., Padhi, S. K., Gall, M., & Bornscheuer, U. T. (2010). The α/β -hydrolase fold 3DM database (ABHDB) as a tool for

- protein engineering. *ChemBioChem*, 11(12), 1635-1643.
- Lal, R., Dadhwal, M., Kumari, K., Sharma, P., Singh, A., Kumari, H. & Verma, M. (2008). *Pseudomonas* sp. to *Sphingobium indicum*: a journey of microbial degradation and bioremediation of hexachlorocyclohexane. *Indian journal of microbiology*, 48(1), 3-18.
- Lee, Y. S. (2016). Isolation and Characterization of a Novel Cold-Adapted Esterase, MtEst45, from *Microbulbifer thermotolerans* DAU221. *Frontiers in microbiology*, 7.
- Leis B., Angelov, A., Mientus, M., Li, H., Pham, V. T., Lauinger, B. & Liebl, W. (2015). Identification of novel esterase-active enzymes from hot environments by use of the host bacterium *Thermus thermophilus*. *Frontiers in microbiology*, 6.
- Levisson, M., van der Oost, J., & Kengen, S. W. (2009). Carboxylic ester hydrolases from hyperthermophiles. *Extremophiles*, 13(4), 567-581.
- López-López, O., E Cerdan, M., & I Gonzalez Siso, M. (2014). New extremophilic lipases and esterases from metagenomics. *Current Protein and Peptide Science*, 15(5), 445-455.
- López-López, O., Fuciños, P., Pastrana, L., Rúa, M. L., Cerdán, M. E., & González-Siso, M. I. (2010). Heterologous expression of an esterase from *Thermus thermophilus* HB27 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of biotechnology*, 145(3), 226-232.
- Lorenz, P., & Eck, J. (2005). Metagenomics and industrial applications. *Nature Reviews Microbiology*, 3(6), 510-516.
- Marangoni, A. G. (2003). *Enzyme kinetics: a modern approach*. John Wiley & Sons.
- Martínez-Martínez, M., Alcaide, M., Tchigvintsev, A., Reva, O., Polaina, J., Bargiela, R., & Eguizabal, E. R. (2013). Biochemical diversity of carboxyl esterases and lipases from Lake Arreo (Spain): a metagenomic approach. *Applied and*

environmental microbiology, 79(12), 3553-3562.

Mohamed, Y. M., Ghazy, M. A., Sayed, A., Ouf, A., El-Dorry, H., & Siam, R. (2013). Isolation and characterization of a heavy metal-resistant, thermophilic esterase from a Red Sea Brine Pool. *Scientific reports*, 3.

Moiseeva, O. V., Solyanikova, I. P., Kaschabek, S. R., Gröning, J., Thiel, M., Golovleva, L. A., & Schlömann, M. (2002). A new modified ortho cleavage pathway of 3-chlorocatechol degradation by *Rhodococcus opacus* 1CP: genetic and biochemical evidence. *Journal of bacteriology*, 184(19), 5282-5292.

N. Jisha, V., B. Smitha, R., Pradeep, S., Sreedevi, S., N. Unni, K., Sajith, S., Priji, P., Sarath Josh, M. and Benjamin, S. (2013) Versatility of microbial proteases. *Advances in Enzyme Research*, 1, 39-51.

Nacke, H., Will, C., Herzog, S., Nowka, B., Engelhaupt, M., & Daniel, R. (2011). Identification of novel lipolytic genes and gene families by screening of metagenomic libraries derived from soil samples of the German Biodiversity Exploratories. *FEMS microbiology ecology*, 78(1), 188-201.

Nishimura, M., & Inouye, S. (2000). Inhibitory effects of carbohydrates on cholesterol esterase biosynthesis in *Streptomyces lavendulae* H646-SY2. *Journal of bioscience and bioengineering*, 90(5), 564-566.

Ogawa, J., & Shimizu, S. (2002). Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in Japan. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 367-375.

Oh, K. H., Nguyen, G. S., Kim, E. Y., Kourist, R., Bornscheuer, U., Oh, T. K., & Yoon, J. H. (2012). Characterization of a novel esterase isolated from intertidal flat metagenome and its tertiary alcohols synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 80, 67-73.

Park, Y. J., Choi, S. Y., & Lee, H. B. (2006). A carboxylesterase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1; purification, characterization, and

-
- expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1760(5), 820-828.
- Patrick, K. (2004). Enzyme technology improves efficiency, cost, safety of stickies removal program. *Paper Age*, 120, 22-25.
- Peng, Q., Wang, X., Shang, M., Huang, J., Guan, G., Li, Y., & Shi, B. (2014). Isolation of a novel alkaline-stable lipase from a metagenomic library and its specific application for milkfat flavor production. *Microbial cell factories*, 13(1), 1.
- Peng, Q., Zhang, X., Shang, M., Wang, X., Wang, G., Li, B., Wang, Y. (2011). A novel esterase gene cloned from a metagenomic library from neritic sediments of the South China Sea. *Microbial cell factories*, 10(1), 1
- Pereira, M. R., Mercaldi, G. F., Maester, T. C., Balan, A., & de Macedo Lemos, E. G. (2015). Est16, a New Esterase Isolated from a Metagenomic Library of a Microbial Consortium Specializing in Diesel Oil Degradation. *PloS one*, 10(7), e0133723.
- Pontes, D. S., Lima-Bittencourt, C. I., Chartone-Souza, E., & Nascimento, A. M. A. (2007). Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 34(7), 463-473.
- Privé, F., Newbold, C. J., Kaderbhai, N. N., Girdwood, S. G., Golyshina, O. V., Golyshin, P. N., & Huws, S. A. (2015). Isolation and characterization of novel lipases/esterases from a bovine rumen metagenome. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(13), 5475-5485.
- Ramchuran, S. O., Vargas, V. A., Hatti-Kaul, R., & Karlsson, E. N. (2006). Production of a lipolytic enzyme originating from *Bacillus halodurans* LBB2 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Applied microbiology and biotechnology*, 71(4), 463-472.
- Rao, L., Xue, Y., Zheng, Y., Lu, J. R., & Ma, Y. (2013). A novel alkaliphilic *Bacillus* esterase belongs to the 13 th bacterial lipolytic enzyme family. *PloS one*, 8(4), e60645.

- Rashamuse, K., Ronneburg, T., Hennessy, F., Visser, D., Van Heerden, E., Piater, L., & Brady, D. (2009). Discovery of a novel carboxylesterase through functional screening of a pre-enriched environmental library. *Journal of applied microbiology*, 106(5), 1532-1539.
- Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 525-552.
- Robles-Medina, A., González-Moreno, P. A., Esteban-Cerdán, L., & Molina-Grima, E. (2009). Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology advances*, 27(4), 398-408.
- Rocha, S. N., Abrahão-Neto, J., Cerdán, M. E., Gombert, A. K., & González-Siso, M. I. (2011). Heterologous expression of a thermophilic esterase in *Kluyveromyces* yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(2), 375-385.
- Rodríguez, M. C., Loaces, I., Amarelle, V., Senatore, D., Iriarte, A., Fabiano, E., & Noya, F. (2015). Est10: A novel alkaline esterase isolated from bovine rumen belonging to the new family XV of lipolytic enzymes. *PloS one*, 10(5), e0126651.
- Rojas-Herrera, R., Zamudio-Maya, M., Arena-Ortiz, L., Pless, R. C., & O'Connor-Sánchez, A. (2011). Microbial diversity, metagenomics and the Yucatán aquifer. *Phyton (Buenos Aires)*, 80, 231-240.
- Sabree, Z. L., Rondon, M. R., & Handelsman, J. (2009). Metagenomics. *Encyclopedia of Microbiology*, 622-632.
- Salis, A., Meloni, D., Ligas, S., Casula, M. F., Monduzzi, M., Solinas, V., & Dumitriu, E. (2005). Physical and chemical adsorption of *Mucor javanicus* lipase on SBA-15 mesoporous silica. Synthesis, structural characterization, and activity performance. *Langmuir*, 21(12), 5511-5516.
- Schmitter-Soto, J. J., Comín, F. A., Escobar-Briones, E., Herrera-Silveira, J., Alcocer, J.,

-
- Suárez-Morales, E. & Steinich, B. (2002). Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico). *Hydrobiologia*, 467(1-3), 215-228.
- Selvin, J., Kennedy, J., Lejon, D. P., Kiran, G. S., & Dobson, A. D. (2012). Isolation identification and biochemical characterization of a novel halo-tolerant lipase from the metagenome of the marine sponge *Haliclona simulans*. *Microbial cell factories*, 11(1), 1.
- Shah, K. R., Patel, P. M., & Bhatt, S. A. (2007). Lipase production by *Bacillus* sp. under different physio-chemical conditions. *Journal of Cell and Tissue Research*, 7(1), 913.
- Shao, W., & Wiegel, J. (1995). Purification and characterization of two thermostable acetyl xylan esterases from *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL-YS485. *Applied and environmental microbiology*, 61(2), 729-733.
- Skals, P. B., Krabek, A., Nielsen, P. H., & Wenzel, H. (2008). Environmental assessment of enzyme assisted processing in pulp and paper industry. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 13(2), 124-132.
- Sleator, R. D., Shortall, C., & Hill, C. (2008). Metagenomics. *Letters in applied microbiology*, 47(5), 361-366.
- Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*, 115(2), 113-128.
- Sriyapai, P., Kawai, F., Siripoke, S., Chansiri, K., & Sriyapai, T. (2015). Cloning, Expression and Characterization of a Thermostable Esterase HydS14 from *Actinomadura* sp. Strain S14 in *Pichia pastoris*. *International journal of molecular sciences*, 16(6), 13579-13594.
- Steele, H. L., Jaeger, K. E., Daniel, R., & Streit, W. R. (2009). Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenomes. *Journal of molecular microbiology and*

biotechnology, 16(1-2), 25-37.

- Tchigvintsev, A., Tran, H., Popovic, A., Kovacic, F., Brown, G., Flick, R. & Khusnutdinova, A. (2015). The environment shapes microbial enzymes: five cold-active and salt-resistant carboxylesterases from marine metagenomes. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(5), 2165-2178.
- Tekincanli, M. A., Akatin, M. Y., & Colak, A. (2015). Purification and characterization of a novel thermostable esterase from *Thermus* sp. NCCB 100425T/*Thermus* sp. NCCB 100425T'den yeni bir ısıya dayanıklı esterazın saflaştırılması ve karakterizasyonu. *Turkish Journal of Biochemistry*, 40(2), 116-124.
- Tirawongsaroj, P., Sriprang, R., Harnpicharnchai, P., Thongaram, T., Champreda, V., Tanapongpipat, S., & Eurwilaichitr, L. (2008). Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. *Journal of Biotechnology*, 133(1), 42-49.
- Torsvik, V., Goksøyr, J., & Daae, F. L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 56(3), 782-787.
- Uchiyama, T., & Miyazaki, K. (2009). Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Current opinion in biotechnology*, 20(6), 616-622.
- Villegas, A., & Kropinski, A. M. (2008). An analysis of initiation codon utilization in the Domain Bacteria—concerns about the quality of bacterial genome annotation. *Microbiology*, 154(9), 2559-2661.
- Wang, B. Z., Guo, P., Zheng, J. W., Hang, B. J., Li, L., He, J., & Li, S. P. (2011). *Spingobium wenxiniae* sp. nov., a synthetic pyrethroid (SP)-degrading bacterium isolated from activated sludge in an SP-manufacturing wastewater treatment facility. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(8), 1776-1780.
- Warren, R. L., Freeman, J. D., Levesque, R. C., Smailus, D. E., Flibotte, S., & Holt, R. A.

-
- (2008). Transcription of foreign DNA in *Escherichia coli*. *Genome research*, 18(11), 1798-1805.
- Xin, L., & Hui-Ying, Y. (2013). Purification and characterization of an extracellular esterase with organic solvent tolerance from a halotolerant isolate, *Salimicrobium* sp. LY19. *BMC biotechnology*, 13(1), 108.
- Yan, Q. X., Wang, Y. X., Li, S. P., Li, W. J., & Hong, Q. (2010). *Sphingobium qiguonii* sp. nov., a carbaryl-degrading bacterium isolated from a wastewater treatment system. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(12), 2724-2728.
- Zhang, T., Han, W. J., & Liu, Z. P. (2009). Gene cloning and characterization of a novel esterase from activated sludge metagenome. *Microbial cell factories*, 8(1), 1.
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics*, 9(1), 40.
- Zuo, K., Zhang, L., Yao, H., & Wang, J. (2010). Isolation and functional expression of a novel lipase gene isolated directly from oil-contaminated soil. *Acta Biochimica Polonica*, 57(3), 305.