



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE PREGRADO

AISLAMIENTO, EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN GEN  
CODIFICANTE PARA LIPASA A PARTIR DE BACTERIAS DE ORIGEN MARINO  
ANTÁRTICO

Memoria de Título Entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los  
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

LORETO PAULINA PARRA ATALA

Director de Memoria de Título: Dr. Juan A. Asenjo De Leuze

Santiago - Chile

Noviembre, 2006



**“AISLAMIENTO, EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN GEN  
CODIFICANTE PARA LIPASA A PARTIR DE BACTERIAS DE  
ORIGEN MARINO ANTÁRTICO”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

***LORETO PAULINA PARRA ATALA.***

*Dr. Juan Asenjo D’Leuxe*  
**Director Seminario de Título**

\_\_\_\_\_

**Comisión de Evaluación Seminario de Título**

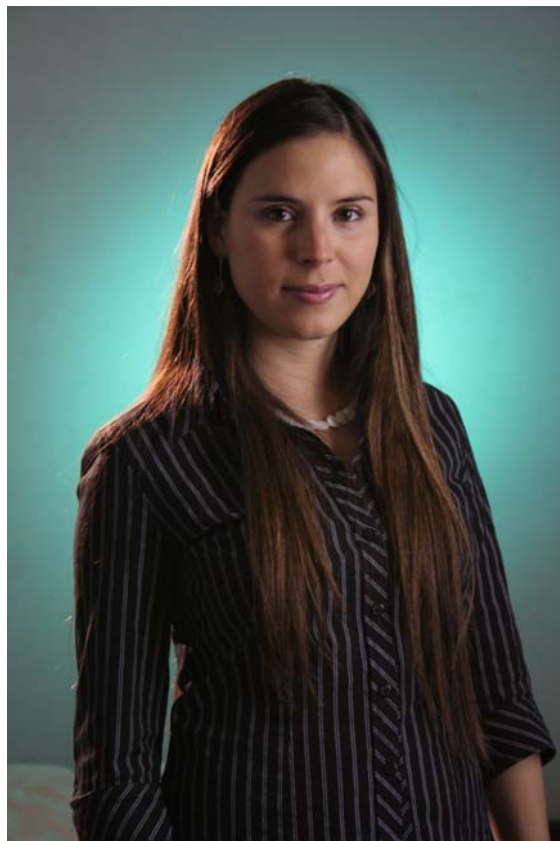
*Dr. Octavio Monasterio Opazo*  
**Presidente Comisión**

\_\_\_\_\_

*Dra. Rosalba Lagos Mónaco*  
**Correctora**

\_\_\_\_\_

Santiago de Chile, Noviembre de 2006



El año 1998 salí de cuarto medio del colegio André English School, rendí la prueba de aptitud e ingresé al programa académico de Bachillerato que impartía la Universidad de Chile. Siempre supe que mi interés profesional estaba relacionado con el área de las ciencias, específicamente con la investigación, pero fue durante mi primer año en la Universidad que me enteré acerca de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Me di cuenta que reunía muchas de las áreas hacia las cuales siempre sentí atracción e interés por conocer y así fue como en año 2000 ingresé a estudiar esta carrera.

Han pasado 6 años y llegó el día que en un principio se veía tan lejano, el término de esta primera etapa de estudio. Aprendí muchas cosas durante estos años. Muchas fueron las horas de estudio, dedicación y esfuerzo necesarias para terminar este largo periodo. Sin embargo, todo esto ahora me motiva a seguir estudiando, con el fin de adquirir más conocimientos y experiencia en esta área de múltiples aplicaciones y proyecciones como es la Biotecnología.

A mi familia,  
con mucho cariño.

## AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, me gustaría agradecer a mi profesor guía, Dr. Juan Asenjo, por haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis junto a su equipo y por haber confiado siempre en mi trabajo, apoyándome continuamente.

Asimismo, agradezco a las profesoras del centro Dra. Bárbara Andrews, Dra. Oriana Salazar, Dra. Ziomara Gerdtzen y Dra. María Elena Lienqueo por la voluntad de responder siempre mis inquietudes.

Muchas gracias a mis compañeros del laboratorio Andrés Barriga, Juan Pablo Acevedo, Fernando Reyes y Cristian Salgado por su gran ayuda y apoyo en todo lo que fue mi trabajo de tesis y por darme la oportunidad de conocer las grandes personas que son.

Gracias a mis compañeros de laboratorio Pía, Consuelo, Claudia, Carolina, Paola, Macarena, Matías, Darío y Álvaro por su continuo apoyo y por todos los momentos gratos que pasé con ellos. Asimismo, agradezco a Nancy, por tener siempre buena disposición para ayudarme en lo que necesité. Ojalá que esa alegría que los caracteriza a todos siga por siempre, ya que con ella se hacen los días más agradables.

Gracias a mis amigos Pancha, Daniela, Geral, Mónica, Jorge y Pepe por su amistad durante estos años y por haber estado conmigo siempre, en los buenos y malos momentos.

Finalmente quiero agradecer a mi familia, por apoyarme incondicionalmente en esta etapa de mi vida. No fue fácil y estuvo llena de altos y bajos, sin embargo, ellos siempre tuvieron la palabra precisa para darme el ánimo necesario para terminar con éxito este periodo.

## INDICE DEL CONTENIDO

<b>DEDICATORIA</b>	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>v</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>ix</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Enzimas lipolíticas: Lipasas</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Estructura y mecanismo catalítico de las lipasas</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Aplicaciones industriales de las lipasas</b>	<b>7</b>
<b>1.4 La vida en ambientes extremos</b>	<b>8</b>
<b>1.5 Enzimas adaptadas y activas a bajas temperaturas</b>	<b>9</b>
<b>1.6 Aplicaciones biotecnológicas de enzimas activas a bajas temperaturas</b>	<b>11</b>
<b>1.7 Lipasas activas a bajas temperaturas</b>	<b>12</b>
<b>1.8 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>14</b>
<b>1.9 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>14</b>
<b>2 . MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Materiales</b>	<b>15</b>
2.1.1 Cepas bacterianas	15
2.1.2 Reactivos	15
2.1.3 Vectores de clonamiento y expresión	16
2.1.4 Medios de cultivo líquidos	19
2.1.4.1 Medio marino 2216	19
2.1.4.2 Medio SOB	19
2.1.4.3 Medio Luria-Bertani	20
2.1.4.4 Medio TB	20
2.1.4.5 Medio rico con glucosa y ampicilina	20
2.1.5 Medios de cultivo sólidos	20
2.1.5.1 Placas de agar con rodamina B-aceite de oliva	20
2.1.6 Soluciones Stock	21
<b>2.2 Métodos</b>	<b>22</b>
2.2.1 Cultivo de microorganismos	22
2.2.1.1 Crecimiento y mantención de microorganismos	22
2.2.1.2 Crecimiento de cepas en cultivos líquidos	22
2.2.2 Selección de cepas productoras de lipasa	22
2.2.3 Extracción DNA genómico de bacterias	23
2.2.4 Determinación de pureza y concentración de DNA	23

2.2.5	Diseño de Oligonucleótidos	23
2.2.5.1	Diseño de partidores para la amplificación de un fragmento de gen de lipasa	24
2.2.5.2	Diseño de partidores y adaptadores para la obtención de las secuencias río arriba y río abajo del gen de lipasa.	24
2.2.5.3	Diseño de partidores para el clonamiento del gen de lipasa aislado en los vectores de expresión.	25
2.2.6	Amplificación de DNA mediante PCR	25
2.2.6.1	Amplificación de DNA con <i>Taq</i> DNA polimerasa	25
2.2.6.2	Amplificación de DNA con Elongasa®	27
2.2.7	Electroforesis de DNA	28
2.2.8	Purificación de DNA a partir de geles de agarosa	28
2.2.9	Ligación de fragmentos de DNA en vectores de clonamiento y expresión	29
2.2.9.1	Ligación en el vector de clonamiento pGEM-T Easy	29
2.2.9.2	Ligación en los vectores de expresión pET22b(+) y pMAL-c2E	29
2.2.10	Preparación de células electrocompetentes	30
2.2.11	Transformación de células electrocompetentes	30
2.2.12	PCR de Colonias	31
2.2.13	Minipreparación de DNA plasmidial	31
2.2.14	Digestión de DNA con enzimas de restricción	32
2.2.14.1	Digestión de DNA plasmidial	32
2.2.14.2	Digestión de DNA genómico	33
2.2.15	Secuenciación de DNA y análisis de secuencia	33
2.2.16	Amplificación del DNAr 16S	34
2.2.17	Construcción de árboles filogenéticos para análisis 16S y proteína lipasa	34
2.2.18	Búsqueda de las secuencias río arriba y río abajo del gen codificante para lipasa.	36
2.2.18.1	Construcción del oligo-adaptador	36
2.2.18.2	Construcción de la genoteca-adaptador	37
2.2.18.3	Elongación y amplificación de los extremos 3' y 5' del gen de lipasa	37
2.2.19	Hibridación Southern	40
2.2.20	Análisis de la secuencia río arriba del gen codificante para lipasa	43
2.2.21	Obtención de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	43
2.2.21.1	Inducción de la síntesis de proteínas recombinantes mediante el sistema de expresión <i>E. coli</i> BL21(D3E)/pET22b(+)	44
2.2.21.2	Inducción de la síntesis de proteínas recombinantes mediante el sistema de expresión <i>E. coli</i> TB1/pMALc2E	45
2.2.21.3	Purificación de la proteína recombinante mediante el sistema de expresión <i>E. coli</i> BL21(D3E)/pET22b(+)	45
2.2.21.4	Purificación de la proteína recombinante mediante el sistema de expresión <i>E. coli</i> TB1/pMALc2E	47
2.2.22	Determinación de la concentración de proteína	50
2.2.23	Electroforesis de proteínas	50
2.2.24	Medición de actividad lipolítica	51
2.2.24.1	Ensayo de actividad <i>in situ</i>	51
2.2.24.2	Ensayo de actividad líquido	52
2.2.24.3	Caracterización de la proteína recombinante	53
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>56</b>
<b>3.1</b>	<b>Selección de cepas productoras de lipasa</b>	<b>56</b>
<b>3.2</b>	<b>Extracción de DNA genómico de las cepas seleccionadas</b>	<b>57</b>
<b>3.3</b>	<b>Diseño de partidores para la amplificación de un fragmento de gen codificante para lipasa</b>	<b>58</b>

<b>3.4</b>	<b>Amplificación de DNA genómico utilizado partidores diseñados para lipasa</b>	<b>61</b>
<b>3.5</b>	<b>Análisis 16S de la cepa 2-17</b>	<b>64</b>
<b>3.6</b>	<b>Búsqueda de las secuencias río arriba y río abajo del gen codificante para lipasa</b>	<b>66</b>
3.6.1	Diseño de partidores para la obtención de las secuencias río arriba y río abajo	67
3.6.2	Digestión DNA genómico de la cepa 2-17	68
3.6.3	Validación del método mediante Southern Blot	70
<b>3.7</b>	<b>Análisis de la secuencia de lipasa obtenida</b>	<b>71</b>
<b>3.8</b>	<b>Análisis filogenético de la secuencia de lipasa</b>	<b>72</b>
<b>3.9</b>	<b>Análisis de la secuencia río arriba del gen codificante para lipasa</b>	<b>73</b>
<b>3.10</b>	<b>Expresión recombinante del gen de lipasa aislado en <i>E. coli</i></b>	<b>74</b>
<b>3.11</b>	<b>Producción de lipasa recombinante en <i>E. coli</i></b>	<b>77</b>
3.11.1	Expresión utilizando el sistema de expresión <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET22b(+)	77
3.11.2	Expresión utilizando el sistema de expresión <i>E. coli</i> TB1/pMAL-c2E	79
<b>3.12</b>	<b>Ensayos de actividad lipolítica y caracterización de la lipasa quimérica</b>	<b>80</b>
<b>3.13</b>	<b>Separación de la lipasa de la MBP</b>	<b>85</b>
<b>4</b>	<b>. DISCUSIÓN</b>	<b>87</b>
<b>5</b>	<b>. CONCLUSIONES</b>	<b>103</b>
<b>6</b>	<b>. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>. MATERIAL COMPLEMENTARIO</b>	<b>110</b>
7.1	Secuencia nucleotídica del gen codificantes para lipasa aislado a partir de una bacteria de origen marino antártico del género <i>Psychrobacter</i> .	110
7.2	Secuencia río arriba del gen codificante para lipasa.	111
7.3	Secuencia nucleotídica parcial del RNA ribosomal 16S de la cepa 2-17, aislado de origen marino Antártico.	112
7.3	Alineamiento mediante Blastp de la lipasa obtenida de la cepa 2-17 con lipasa 2 de <i>Moraxella</i> sp.	113



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos utilizados durante el trabajo de tesis. ....	16
Tabla 2. Partidores y adaptadores para la obtención de las secuencias río arriba y río abajo del gen de lipasa. ....	24
Tabla 3. Partidores utilizados para la expresión del gen codificante para lipasa. ....	25
Tabla 4. Enzimas de restricción utilizadas durante el trabajo de tesis. ....	32
Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de fragmentos de genes codificantes para lipasas activas a bajas temperaturas. ....	60
Tabla 7. Tamaños esperados de amplificados. ....	61
Tabla 8. Resultado de Blastx a la secuencia de 240 pb. ....	64
Tabla 9. Resultado de Blastp a la secuencia de la lipasa aislada. ....	72
Tabla 10. Vectores recombinantes y sus características. ....	76

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama del plegamiento $\alpha/\beta$ -hidrolasa.....	4
Figura 2. Mecanismo catalítico de lipasas. ....	6
Figura 3. Vectores de clonamiento y expresión. ....	18
Figura 4. AdaptHindIIItotal. ....	36
Figura 5. Diagrama de técnica de genome walking empleada para la obtención de las secuencias río arriba y río abajo del gen de lipasa. ....	39
Figura 6. Transferencia del DNA desde el gel a la membrana de nylon. ....	41
Figura 7. Curva de calibración de <i>p</i> -nitrofenol. ....	54
Figura 8. Identificación de cepas productoras de lipasa en placas de agar-rodamina B. ....	56
Figura 9. Análisis electroforético del DNA genómico de cepas productoras de lipasa. ....	57
Figura 10. Alineamiento de lipasas psicrófilas. ....	59
Figura 11. Electroforesis de los productos de amplificación. ....	62
Figura 12. Electroforesis de los productos de digestión de vectores con <i>EcoRI</i> . ....	63
Figura 13. Análisis de la secuencia del fragmento de gen codificante para lipasa. ....	63
Figura 14. Análisis electroforético del producto de amplificación del DNA 16S. ....	64
Figura 15. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen de RNA ribosomal 16S. ....	66
Figura 16. Partidores para la amplificación de secuencias río arriba y río abajo del gen de lipasa. ....	67
Figura 17. Digestión DNA genómico de la cepa 2-17. ....	68
Figura 18. Análisis electroforético de los productos de PCR para la obtención de los extremos 3' y 5' del fragmento de gen codificante para lipasa. ....	69
Figura 19. Hibridación Southern del gen de lipasa sobre DNA genómico de la cepa 2-17 .....	70
Figura 20. Secuencia aminoacídica de la lipasa. ....	71
Figura 21. Árbol filogenético basado en la secuencia de la lipasa aislada. ....	73
Figura 22. Alineamiento de regiones promotoras de <i>phTAC125</i> y del gen codificante para lipasa. ....	74
Figura 23. Productos amplificados del gen aislado para insertar sitios de restricción. ....	75
Figura 24. Análisis de restricción de los vectores pETLip y pMALcLip. ....	77
Figura 25. Análisis electroforético de la expresión de la lipasa mediante el sistema BL21(DE3)/pET22 y su purificación parcial. ....	78
Figura 26. Análisis electroforético de la expresión y purificación parcial de la lipasa mediante el sistema pMAL-c2E. ....	79
Figura 27. Ensayo de actividad lipolítica <i>in situ</i> para la lipasa quimérica. ....	80
Figura 28. Curvas de progreso a diferentes temperaturas. ....	81
Figura 29. Dependencia de la temperatura en la actividad lipolítica. ....	82
Figura 30. Efectos de la temperatura en la actividad hidrolítica de la lipasa. ....	83
Figura 31. Gráfico de Arrhenius para la lipasa quimérica. ....	84
Figura 32. Digestión de la lipasa quimérica con enteroquinasa. ....	85
Figura 33. Fracciones recolectadas de la cromatografía de intercambio iónico. ....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS

1Kpb	Marcador de peso molecular 1Kbp
Amp	Ampicilina
Aa	Aminoácidos
DNAr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
RNAr	Ácido ribonucleico ribosomal
BSA	Seroalbúmina de bovino
CIBYB	Centro de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología
dNTPs	Deoxiribonucleótidos trifosfato
OD	Densidad óptica
EDTA	Etilendiaminotetraacetato ácido
$\bar{g}$	Fuerza de gravedad
g	Gramo
h	Hora
HSL	Lipasa sensible a hormonas
IPTG	Isopropil tio- $\beta$ -D-galactósido
kDa	Kilodalton
LB	Medio Luria-Bertani
LED	Lipase Engineering Database ( <a href="http://www.led.uni-stuttgart.de/">www.led.uni-stuttgart.de/</a> )
M	Molar
MBP	Proteína de unión a Maltosa
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
ORF	Marco de lectura abierto
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
PBS	Solución de <i>buffer</i> fosfato
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>p</i> -NFP	Para-nitrofenil palmitato
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
U	Unidad enzimática
$\mu$ F	Microfaradios
UV	Radiación ultravioleta
V	Voltio
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

## RESUMEN

El uso de enzimas adaptadas/activas a bajas temperaturas tiene un alto potencial en términos de menores costos energéticos, aplicaciones terapéuticas y menor contaminación microbiana en procesos industriales. Las bacterias de origen marino antártico mantienen su metabolismo a muy bajas temperaturas, por lo que son particularmente deseadas para la identificación de dichas enzimas.

Las lipasas son enzimas lipolíticas de gran utilidad en la industria biotecnológica. Sus aplicaciones involucran a la producción alimenticia, de detergentes, fármacos enantioméricamente puros, cosméticos, síntesis de compuestos químicos, de biopolímeros y agroquímicos, entre otras.

Se aislaron bacterias de origen marino antártico, que producen enzimas lipolíticas extracelulares con alta actividad a bajas temperaturas. Se seleccionó la mejor cepa y se realizó un análisis del DNAr 16S, que identificó a la cepa como *Psychrobacter sp.* El DNA genómico de este microorganismo se utilizó para realizar una búsqueda de un gen de lipasa utilizando partidores diseñados a partir de los alineamientos múltiples de secuencias aminoacídicas de lipasas con actividad a bajas temperaturas, que son las pertenecientes al grupo de lipasas sensibles a hormonas (HSL) de las especies procariontes. Esto permitió clonar y secuenciar el DNA que codifica parcialmente para una lipasa (240 pb, 80 aa). A partir del fragmento de gen de lipasa obtenido se determinaron las secuencias de los extremos 3' y 5', mediante técnicas de *genome walking* estandarizadas en el laboratorio. Se encontró un ORF de 1.293 pb, que codifica para un polipéptido de 431 aminoácidos y que presenta un 89% de identidad con una lipasa previamente descrita de *Moraxella sp* (lip2). Además, se identificaron dos

regiones altamente conservadas: los péptidos HGGG y GDSAG que son motivos característicos del grupo HSL. También se obtuvieron las secuencias río arriba y río abajo de este gen. El gen de lipasa fue clonado en los vectores de expresión pET22b(+) y pMAL-c2E y fue integrado exitosamente en las cepas *E. coli* BL21(D3E) y TB1. Las cepas seleccionadas fueron inducidas con IPTG para obtener la proteína lipasa recombinante. La lipasa producida por el sistema de expresión *E. coli* BL21(D3E)/pET22b(+) se obtuvo de forma insoluble, por lo que no se continuó su caracterización. Al utilizar el sistema de expresión *E. coli* TB1/pMAL-c2E, se logró producir y purificar una proteína de fusión soluble de aproximadamente 90 kDa con actividad lipolítica. La temperatura a la cual se alcanzó la máxima actividad en las condiciones ensayadas fue de 20°C a pH 8.0 y la energía de activación de 5,5 kcal/mol entre los 5 y 15°C en el mismo pH.

### **ABSTRACT**

The use of adapted/active enzymes to low temperatures has a great potential in terms of lower energy costs, therapeutic applications and lower microbial contamination in industrial processes. Antarctic marine bacteria carry out their metabolism at very low temperatures, therefore they are particularly suitable for identifying such enzymes.

Lipases are very useful lipolytic enzymes in the biotechnological industry. Their industrial application involve the food industry, chemical compounds synthesis, detergent industry, biopolymers and biodiesel synthesis, enantiomerically pure pharmaceutical compounds, agrochemistries like pesticides, flavours compounds, and cosmetic industry.

A number of Antarctic sea water bacteria producing extra cellular lipolytic enzymes with high activity at low temperatures were isolated. The best one was selected to perform a 16S characterization which identified it as a *Psychrobacter* sp. The genomic DNA of this bacterium was used for a PCR screening using primers obtained from lipases aminoacidic sequences multiple alignments active at low temperatures, which belong to the Hormone Sensitive Lipase (HLS) group of the prokaryotes species. These allowed cloning and sequence the DNA that partially encodes a novel lipase protein (240 bp, 80aa). Subsequently the complete gene was obtained by genome-walking technique standardized in the laboratory. An open reading frame of 1.293 bp was found, which encodes for a polypeptide of 431 amino acids, and presents 89% identity of a *Moraxella* sp. lipase gene previously described (lip2). Two conserved regions were identified in this sequence: the HGGG and the GDSAG peptides that are characteristic motifs of the HSL group. The promoter and downstream sequence of this gene were also obtained. The lipase gene was cloned into expression vectors pET22b(+) and pMAL-c2E and successfully integrated into *E. coli* BL21(D3E) and TB1. The selected ones were induced by IPTG to produce the recombinant lipase protein. The lipase produced by the *E. coli* BL21(D3E)/pET22b(+) expression system was insoluble, therefore its characterization was not continued. By using the *E. coli* TB1/pMAL-c2E expression system, a recombinant fusion protein with a molecular weight of 90 KDa was produced and purified with lipolytic activity. The maximum activity of the lipase was detected at 20°C and pH 8.0 in the assay conditions, and the activation energy was 5,5 kcal/mol between 5 and 15°C at the same pH.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

### 1.1 Enzimas lipolíticas: Lipasas

Las enzimas lipolíticas están involucradas en la degradación de lípidos y, por ende, son importantes tanto en la movilización de lípidos intracelulares como en la transferencia de estos entre organismos. Las bacterias producen diferentes clases de enzimas lipolíticas, entre las cuales se encuentran las carboxilesterasas, que hidrolizan ésteres de cadena corta parcialmente solubles en agua; las lipasas verdaderas, que despliegan un máximo de actividad hacia los triacilgliceroles de cadena larga insolubles en agua; y por último, varios tipos de fosfolipasas que catalizan la hidrólisis de fosfolípidos (Pleiss y col., 1998; Arpigny & Jaeger, 1999).

Una lipasa verdadera se define como una carboxilesterasa, que en condiciones acuosas cataliza la hidrólisis y síntesis de acilgliceroles de cadena larga, siendo su sustrato natural el triacilglicerol. Esta reacción produce la liberación de ácidos grasos, diacilglicerol, monoacilglicerol y glicerol (Villeneuve y col., 2000; Jaeger & Eggert, 2002). Los acilgliceroles con una cadena acil de 10 ó más átomos de carbono de largo pueden ser considerados como sustratos para lipasas. Con menos átomos de carbono son sustratos para esterasas, pero la mayoría de las lipasas también pueden utilizar éstos como sustratos (Jaeger y col., 1999). Además catalizan un amplio rango de reacciones que incluyen hidrólisis e interesterificación, alcoholisis, esterificación y aminólisis.

Las reacciones lipolíticas ocurren en una interfase lípido-agua, los sustratos lipídicos usualmente forman un equilibrio entre los estados monoméricos, micelar y

emulsionado. Se han utilizado dos criterios para definir una enzima lipolítica como lipasa verdadera: i) debe ser activada por la presencia de una interfase, es decir, su actividad debe aumentar en cuanto el sustrato triglicérido forme una emulsión, fenómeno que se conoce con el nombre de activación interfacial. ii) la existencia de una tapa, que es un *loop* en la superficie de la proteína que cubre el sitio activo de la enzima y que se abre al contacto de la interfase (Jaeger y col., 1999). Hay unas pocas excepciones a estos criterios.

La principal fuente de lipasas es la flora microbiana que comprende bacterias, hongos y levaduras. Sin embargo, también es posible encontrar lipasas en el páncreas de mamíferos y en plantas superiores (Pandey y col., 1999).

Las lipasas bacterianas se clasifican en seis familias basadas en la identidad de sus secuencias aminoacídicas. La familia IV corresponde al grupo de las lipasas adaptadas a bajas temperaturas, grupo que también se conoce como HSL (*Hormone Sensitive Lipase*) debido a la similitud estructural que muestran con las lipasas sensibles a hormonas de mamíferos. La familia IV se caracteriza por contener el residuo serina del sitio activo en un pentapéptido consenso GDSAG, que se ubica cerca del extremo amino terminal de la proteína. También tienen otro motivo altamente conservado HGGG de función desconocida ubicado inmediatamente río arriba del motivo consenso del sitio activo (Kanaya y col., 1998; Arpigny & Jaeger, 1999; Jaeger y col, 1999).

Entre las características que hacen a las lipasas atractivas, al ser el grupo más utilizado como biocatalizadores en química orgánica se encuentran: i) su capacidad de ser quimioselectivas, regioselectivas y estereoselectivas (Jaeger & Eggert, 2002); ii) la capacidad de catalizar reacciones que implican sustratos lipídicos insolubles en

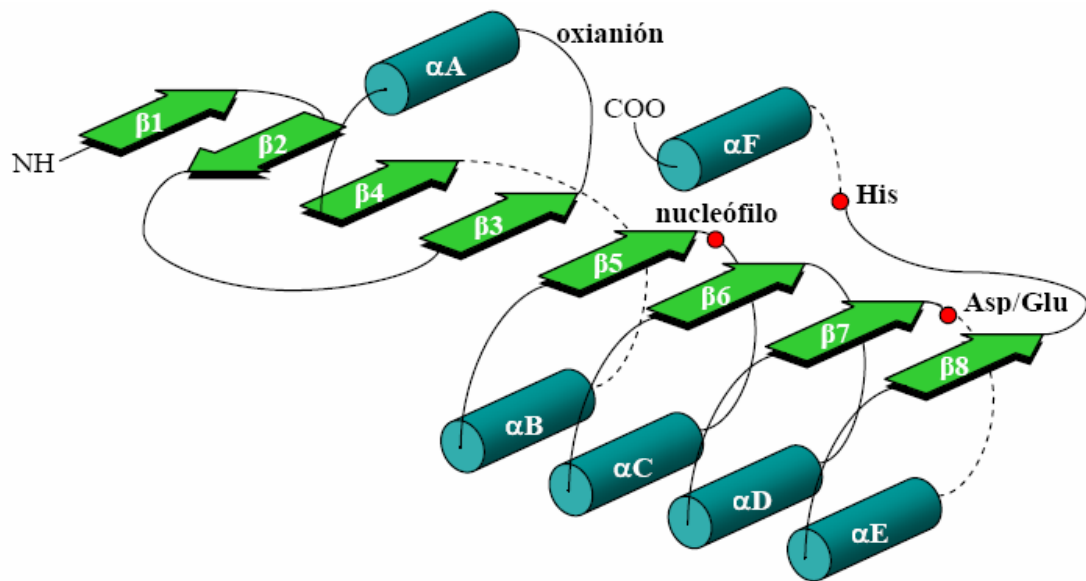


interfases lípido-agua (Villeneuve y col., 2000), iii) la disponibilidad de la estructura cristalina de muchas de las lipasas, con lo que se facilita considerablemente el diseño de estrategias de ingeniería de proteínas, iv) no necesitan de cofactores (Jaeger & Eggert, 2002), v) ser herramientas poderosas que no sólo catalizan la hidrólisis, sino también muchas reacciones reversas como la esterificación, transesterificación y aminólisis en solventes orgánicos (Villeneuve y col., 2000). Esto se ha visto reflejado con la aparición de un promedio de 1.000 publicaciones originales al año sobre lipasas (Jaeger y col., 1994; Jaeger y col., 1999; Pandey y col., 1999; Jaeger & Eggert, 2002).

## **1.2 Estructura y mecanismo catalítico de las lipasas**

Las lipasas comparten un patrón común de plegamiento denominado  $\alpha/\beta$  hidrolasa. Este plegamiento es compartido entre las demás enzimas lipolíticas (esterasas y cutinasas), como también por enzimas tan diversas como haloalcano deshalogenasas, acetilcolinesterasas, dienolactona hidrolasas, serina peptidasas y  $\alpha$ -amilasas (Jaeger y col., 1999; Gupta y col., 2004). El plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa consiste en ocho hebras  $\beta$  centrales dispuestas en forma paralela a excepción de la segunda hebra  $\beta$  dispuesta en sentido antiparalelo. Las hebras paralelas desde la  $\beta_3$  a la  $\beta_8$  están conectadas por  $\alpha$  hélices. El sitio activo de las enzimas con plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa consiste en tres residuos catalíticos: un residuo nucleófilo (serina, cisteína o aspartato), un residuo catalítico (aspartato o glutamato) y un residuo de histidina, siempre en este orden en la secuencia de aminoácidos. En las lipasas el nucleófilo es siempre una serina, que se encuentra en el pentapéptido altamente conservado Gly-X-Ser-X-Gly que forma un doblez tipo  $\gamma$  entre la lámina  $\beta_5$  y la  $\alpha$  hélice contigua, lo que forma la estructura más

conservada del plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa. Como existe un contacto cercano entre los residuos, dos posiciones antes y dos después de la serina, ambos son glicinas. Estos pueden ser sustituidos por otros residuos pequeños. El residuo catalítico ácido (Asp-Glu) se encuentra después de la hebra  $\beta_7$ . Está enlazado por un hidrógeno a la histidina del sitio activo, sin embargo, su posición parece ser variable. El tercer residuo catalítico en lipasas es la histidina catalítica, residuo que se ubica en un *loop* después de la hebra  $\beta_8$  del plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa. El largo y la conformación del *loop* son variables (Figura 1) (Jaeger y col., 1999; Pleiss y col., 2000; Fischer & Plaiss, 2003).

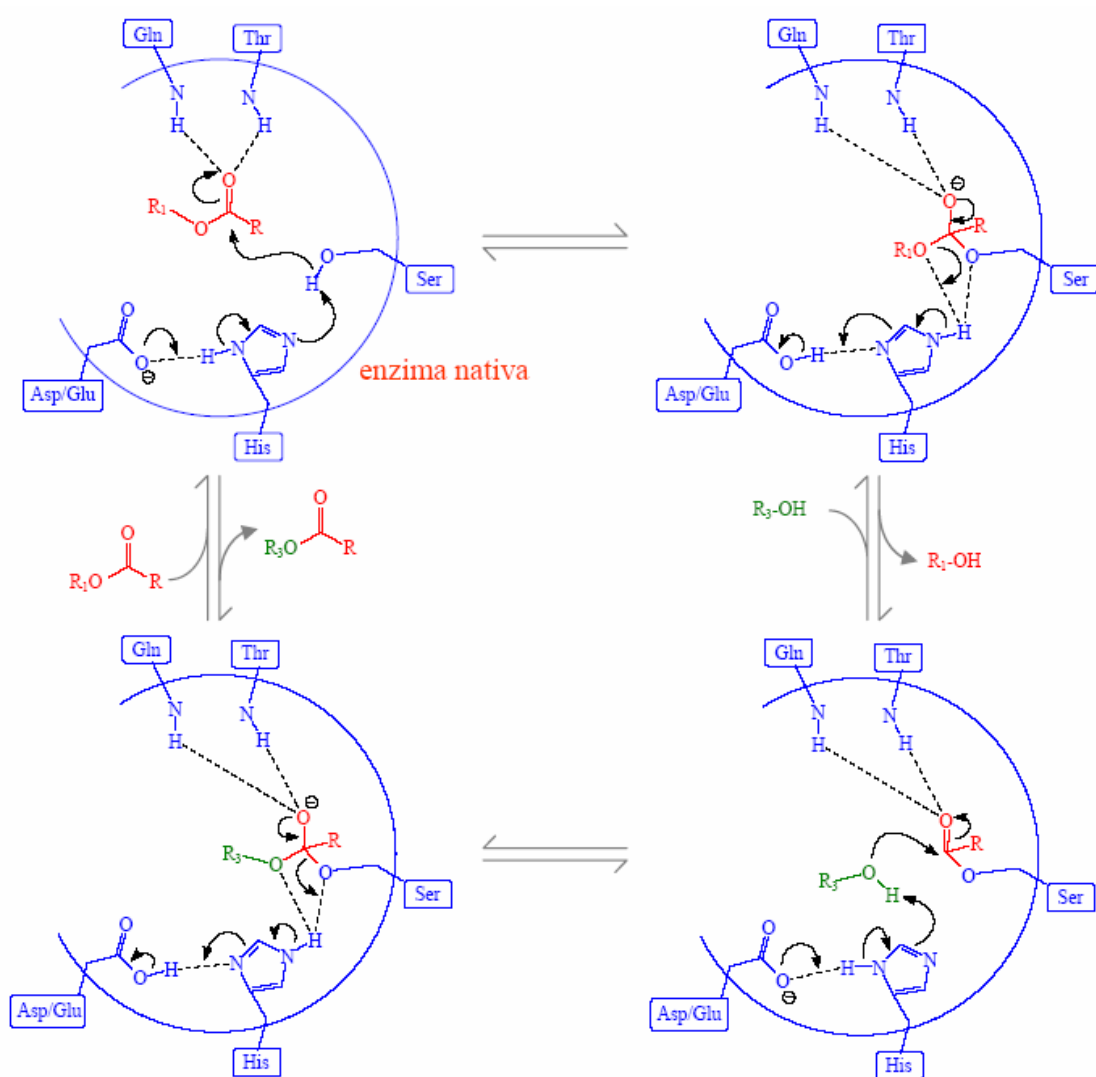


**Figura 1.** Diagrama del plegamiento  $\alpha/\beta$ -hidrolasa

Las hélices  $\alpha$  y las hebras  $\beta$  están representadas por cilindros y flechas, respectivamente. La ubicación topológica de los residuos del sitio activo está señalada por círculos. Las líneas discontinuas indican la localización de posibles inserciones (Jaeger y col., 1999).

Adicionalmente, el sitio activo consta de tres hendiduras o bolsillos que acomodan las cadenas acilos del sustrato triacilglicerol (denominadas *sn-1*, *sn-2* y *sn-3*). El carácter hidrofóbico y el tamaño de los bolsillos parecieran determinar la preferencia de sustrato, incluyendo la enantioselectividad (Pleiss y col., 1998; Jaeger y col., 1999).

La actividad catalítica de las lipasas consiste en la hidrólisis de los enlaces carboxil-éster presentes en acilgliceroles. Debido a que la triada catalítica es parecida a las presentes en serina proteasas, su catálisis es similar. El mecanismo comienza con la activación de la serina por la histidina vecina y el ataque nucleofílico al sustrato carbonil por el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo del residuo serina. Con esto, se forma un intermediario tetraédrico transitorio, que se estabiliza por residuos de la cavidad oxianiónica. Así, se forma un intermediario covalente donde el componente ácido del sustrato es esterificado al residuo serina de la enzima. Luego una molécula de agua es activada por el residuo de histidina vecino y el ión hidroxilo resultante ataca nucleofílicamente al átomo del carbono carbonilo del intermediario covalente. Finalmente el residuo de histidina dona un protón al átomo de oxígeno del residuo de serina activo, el enlace éster entre la serina y el componente acilo se rompe y el producto es liberado (Figura 2) (Jaeger y col., 1999).



**Figura 2.** Mecanismo catalítico de lipasas.

En el esquema se indican los pasos involucrados en la catálisis enzimática de las lipasas: unión del sustrato, formación del intermediario tetraédrico, formación de intermediario covalente y liberación del producto final y regeneración del catalizador. Si  $R_3 = H$ , reacción de hidrólisis; si  $R_3 \neq H$ , reacción de alcoholólisis o esterificación (Jaeger y col., 1999).

### 1.3 Aplicaciones industriales de las lipasas

Actualmente, las lipasas son de gran utilidad en la industria biotecnológica. En este campo se ha puesto mucha atención en el uso de lipasas de origen microbiano (Pandey y col., 1999). Se han establecido exitosamente nuevas aplicaciones industriales utilizando lipasas para la síntesis de biopolímeros y biodiesel, producción de fármacos enantioméricamente puros, agroquímicos como pesticidas, compuestos saborizantes, en la industria de la cosmética y del cuero, en depósitos de basura, y como biosensores (Pandey y col., 1999; Jaeger & Eggert, 2002). Entre sus principales aplicaciones se encuentran:

Industria alimenticia: Se utilizan con el fin de mejorar el proceso químico tradicional de la manufactura alimenticia. También se ocupan en la producción de variados productos como jugos de frutas, alimentos cocidos, fermentación de vegetales, sabores deseados en quesos e interesterificación de grasas y aceites para producir acilglicerolos modificados (Pandey y col., 1999).

Síntesis de químicos: Las lipasas son intermediarios claves en la síntesis de componentes terapéuticos, agroquímicos y saborizantes. Usualmente éstos son compuestos quirales y químicamente complejos que son difíciles de sintetizar con métodos químicos (Jaeger & Eggert, 2002).

Biosensores: La determinación cuantitativa de triacilglicerolos es de gran importancia, no sólo a nivel clínico. Los biosensores lipídicos también son de gran utilidad en la industria farmacéutica, alimenticia, de aceites y grasas y en el análisis de contaminantes, especialmente pesticidas (Pandey y col., 1999).

Industria de detergentes: Cada año se comercializan más de 1.000 toneladas de lipasas en esta área. Las enzimas lipasas, proteasas, amilasas y celulasas se adicionan a los detergentes y en conjunto catalizan el rompimiento de enlaces químicos con la adición de agua (Jaeger y col., 1999; Pandey y col., 1999).

#### **1.4 La vida en ambientes extremos**

Las condiciones extremas son generalmente aquellas que caben fuera del límite en que los humanos pueden sobrevivir o que son muy hostiles para soportar la vida (Sellek & Chaudhuri, 1999; Sheridan y col., 2000; Bouriotis & Tsigos, 2002; Gomes & Steiner, 2004). Los organismos que habitan en estos ambientes se conocen como extremófilos y se clasifican según la condición extrema que soporten. Estos incluyen termófilos (temperaturas de 55 a 121°C), psicrófilos (temperaturas de -2 a 20°C), acidófilos (pH<4), alcalófilos (pH>8), halófilos ([NaCl] entre 2 y 5 M) y barófilos (presiones mayores que la atmosférica), entre otros (Bouriotis & Tsigos, 2002; Gomes & Steiner, 2004).

Los ambientes extremos que exhiben bajas temperaturas son probablemente los más extensos, pero los menos estudiados. Se estima que cerca del 85% de la biósfera terrestre experimenta temperaturas menores a los 5°C, como los continentes Ártico y Antártico, regiones montañosas y agua marina que cubre un 70% de la superficie y que está más del 75% del tiempo en permanentemente frío (menos de 5°C todo el año) (Gerday y col., 1997; Sellek & Chaudhuri, 1999; Sheridan y col., 2000; Bouriotis & Tsigos, 2002; Gianese y col., 2001). Los organismos psicrófilos se definen por crecer óptimamente a temperaturas menores a los 15°C y a una máxima temperatura de 20°C.

En cambio, los microorganismos psicrotolerantes se definen por su habilidad de crecer a bajas temperaturas, pero muestran un límite máximo hasta de 40°C. En regiones polares como en aguas marinas profundas, los organismos psicrotolerantes son relativamente más abundantes que los psicrofílos (Feller y col., 1996; Huston y col., 2000). Los organismos psicrofílos habitan los ambientes más fríos de la Tierra, que incluyen las regiones polares, altas montañas, glaciares, profundidades oceánicas, superficies de sistemas subterráneos (cuevas), atmósfera alta, electrodomésticos refrigerados y superficies de animales y plantas que viven en ambientes fríos, donde las temperaturas nunca exceden los 5°C (Gomes & Steiner, 2004).

### **1.5 Enzimas adaptadas y activas a bajas temperaturas**

Vivir a temperaturas cercanas a los 0°C requiere de múltiples adaptaciones cruciales, que incluyen arreglos bioquímicos a nivel molecular (síntesis de moléculas especiales), subcelular (regulación de canales iónicos) y de la fisiología completa del organismo (vías metabólicas). Entre ellas se encuentra la necesidad de preservar la estabilidad y la permeabilidad de la membrana y de mantener las actividades enzimáticas a niveles apropiados. Debido a esto, los organismos psicrofílos han desarrollado mecanismos adaptativos para llevar a cabo sus funciones metabólicas a bajas temperaturas incorporando características únicas en sus proteínas y membranas (Feller & Gerday, 1997; Sheridan y col., 2000; Bouriotis & Tsigos, 2002; Gomes & Steiner, 2004).

Las enzimas adaptadas a bajas temperaturas tienen dos características principales, una rápida inactivación a temperaturas moderadamente altas y una alta

actividad específica a bajas temperaturas (Feller y col., 1996). De acuerdo a la ecuación de Arrhenius,  $k_{cat}=Ae^{-E_a/RT}$ , la actividad de una enzima disminuiría fuertemente a bajas temperaturas (Bouriotis & Tsigos, 2002). Como se deduce de esta ecuación, la disminución de la temperatura de 37 a 0°C causaría una disminución exponencial de la tasa de reacción, disminuyendo la actividad de una enzima de 16 a 80 veces (Feller y col., 1996; Bouriotis & Tsigos, 2002). A pesar de esto, los organismos nativos a bajas temperaturas mantienen tasas metabólicas que son suficientes para sobrevivir y crecer, similares a las que muestran los organismos mesófilos a temperaturas moderadas (Bouriotis & Tsigos, 2002). Se espera que la eficiencia catalítica de las enzimas que participan en el metabolismo primario de organismos adaptados a bajas temperaturas sea equivalente a la de enzimas de organismos mesófilos con similares tasas de crecimiento a 37°C. Las verdaderas enzimas adaptadas al frío, deben tener eficiencias catalíticas del mismo orden de magnitud que las enzimas mesófilas a sus respectivas temperaturas óptimas. La temperatura de actividad máxima para una enzima usualmente no es la misma que el organismo alcanza en su crecimiento óptimo. Las enzimas, en general, tienen temperaturas aparentes de actividad máxima que son 10-20°C más altas que la temperatura ideal para el crecimiento del organismo parental (Sheridan y col., 2000).

Comparadas con las proteínas de los mesófilos, las proteínas psicrófilas tienden a tener menores puentes salinos, poseen menos grupos hidrofóbicos y un mayor número de residuos cargados en su superficie. Asimismo, las proteínas activas a bajas temperaturas poseen una reducción en el número de residuos de prolina y arginina (Marshall, 1997). Se ha propuesto que estos cambios estarían correlacionados a un alto nivel de flexibilidad estructural ya sea de toda la proteína o de un dominio en particular



en proteínas con múltiples dominios. El aumento en la flexibilidad estructural probablemente facilitaría los cambios conformacionales, resultando una disminución en la energía requerida para la catálisis a bajas temperaturas (Bouriotis & Tsigos, 2002; Gomes & Steiner, 2004). Una consecuencia esperada del aumento de la flexibilidad es la reducción en la estabilidad térmica (Marshall, 1997).

### **1.6 Aplicaciones biotecnológicas de enzimas activas a bajas temperaturas**

La capacidad de las enzimas psicrófilas para catalizar reacciones a bajas o moderadas temperaturas y su baja estabilidad térmica, ofrece un gran potencial industrial y biotecnológico (Bouriotis & Tsigos, 2002; Gomes & Steiner, 2004). Uno de los principales intereses de las enzimas activas a bajas temperaturas es que no es necesario para su actividad aplicar energía calórica, lo que en consecuencia trae beneficios económicos debido al ahorro energético (Hoyoux y col., 2004). Asimismo, el uso de enzimas activas a bajas temperaturas previene el requerimiento de grandes cantidades de enzima para compensar la menor eficiencia cuando se utilizan enzimas mesófilas a bajas temperaturas. Estas enzimas también se caracterizan por su labilidad térmica, lo que permite su fácil y rápida inactivación cuando sea requerida (Hoyoux y col., 2004).

Algunos ejemplos de estos beneficios biotecnológicos se dan en la industria de los detergentes, donde la ventaja de incorporar enzimas activas a bajas temperaturas conllevaría una reducción en el consumo energético. De esta manera, es posible usar hidrolasas activas a bajas temperaturas como proteasas, lipasas, amilasas y celulasas en la formulación de detergentes, lo que puede significar una gran mejoría para el lavado en frío (Marshall, 1997; Feller y col, 1996; Bouriotis & Tsigos, 2002; Gomes & Steiner,

2004). En la industria alimenticia el uso de enzimas adaptadas a bajas temperaturas permitiría la obtención de productos a temperaturas donde el crecimiento microbiano es mínimo y su uso entregaría mejores alternativas en la fermentación, manufactura de quesos, panaderías y ablandamiento de carnes. Por otro lado, los organismos adaptados al frío tienen un gran potencial en la aplicación de procesos de biorremediación, como por ejemplo en el compostaje y la biodegradación de aceites o xenobióticos (Feller y col., 1996; Marshall, 1997).

### **1.7 Lipasas activas a bajas temperaturas**

Por décadas, las lipasas han sido utilizadas a nivel industrial debido a las diversas aplicaciones que presentan, sobre todo en el área biotecnológica (Jaeger y col., 1994). Las enzimas comerciales provienen de organismos mesófilos y requieren de temperaturas controladas sobre 40°C para alcanzar una adecuada actividad. Sin embargo, muchas de las aplicaciones en que se utilizan no necesitan de temperaturas controladas de operación, sino más bien de temperatura ambiental o de bajas temperaturas, situaciones en que las lipasas mesófilas ven reducida su actividad. Las lipasas adaptadas o activas a bajas temperaturas aparecen como una ideal solución frente a estos inconvenientes (Pandey y col., 1999; Suzuki y col., 2001).

Algunas lipasas producidas por microorganismos psicrófilos han sido investigadas y se han determinado sus secuencias nucleotídicas (Feller y col., 1991; Choo y col., 1998; Suzuki y col., 2001; Rashid y col., 2001; Alquati y col., 2002; Kirk & Christensen, 2002; Abdou, 2003; Ryu y col., 2005). Estas lipasas investigadas han demostrado ser enzimas adaptadas a bajas temperaturas debido a que catalizan la

hidrólisis de lípidos a temperaturas bajo los 3°C. Basándose en el alineamiento de sus secuencias aminoacídicas, se deduce que una característica posiblemente involucrada en la adaptación al frío es la presencia de residuos de glicina en las secuencias conservadas que contienen la serina y la histidina del sitio catalítico, que probablemente les da mayor flexibilidad al sitio catalítico. Una segunda característica importante estaría dada por el pequeño cociente de los residuos aminoacídicos Arg/(Arg + Lys) (Feller y col., 1996). Sin embargo, estas características no han sido confirmadas, debido a que existen pocas lipasas activas a bajas temperaturas descritas en la literatura, las cuales son principalmente caracterizadas en distintas condiciones experimentales, detallándose muy poco acerca de los determinantes de adaptación a las bajas temperaturas. En base a lo anterior la determinación de una nueva secuencia de lipasa con actividad a bajas temperaturas y su caracterización sería un aporte para el estudio sobre la adaptación de proteínas al frío.

## **1.8 OBJETIVO GENERAL**

Aislar, expresar y caracterizar un gen codificante para lipasa a partir de bacterias de origen marino antártico mediante técnicas de PCR.

## **1.9 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aislar, clonar y caracterizar secuencias génicas que codifiquen para lipasas psicrófilas.
- Expresar de forma recombinante el gen codificante para lipasa.
- Caracterizar la proteína recombinante según sus propiedades de actividad a bajas temperaturas.
- Identificar filogenéticamente la especie bacteriana desde la cual fue aislado parcialmente el gen codificante para lipasa.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 2.1 Materiales

#### 2.1.1 Cepas bacterianas

- *E. coli* cepa DH5 $\alpha$ , genotipo: F<sup>-</sup>  $\Phi$ 80dlac $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacaya-argF) U169 *recA1 endA1 hsdR178r<sub>k</sub><sup>-</sup>,m<sub>k</sub><sup>+</sup>*) *phoA supE44  $\lambda$  thi-1 gyrA96 relA1*.
- *E. coli* BL21(D3E), genotipo: F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>+</sup>) gal dcm* (DE3).
- *E. coli* TB1, genotipo: F<sup>-</sup> *ara $\Delta$ (lac-proAB)[ $\Phi$ 80dlac $\Delta$ (lacZ)M15] rpsL(Str<sup>R</sup>) thi hsdR*.
- El resto de las cepas bacterianas fueron aisladas de la Antártica chilena en la Isla Rey Jorge, ubicada en la base aérea Frei Montalva (Lat 62° 11”S Long 58° 58”W). Las muestras se tomaron a partir de la capa superficial del agua de mar en época estival.

#### 2.1.2 Reactivos

Los reactivos utilizados durante el trabajo de tesis y el laboratorio proveedor se detallan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Reactivos utilizados durante el trabajo de tesis.

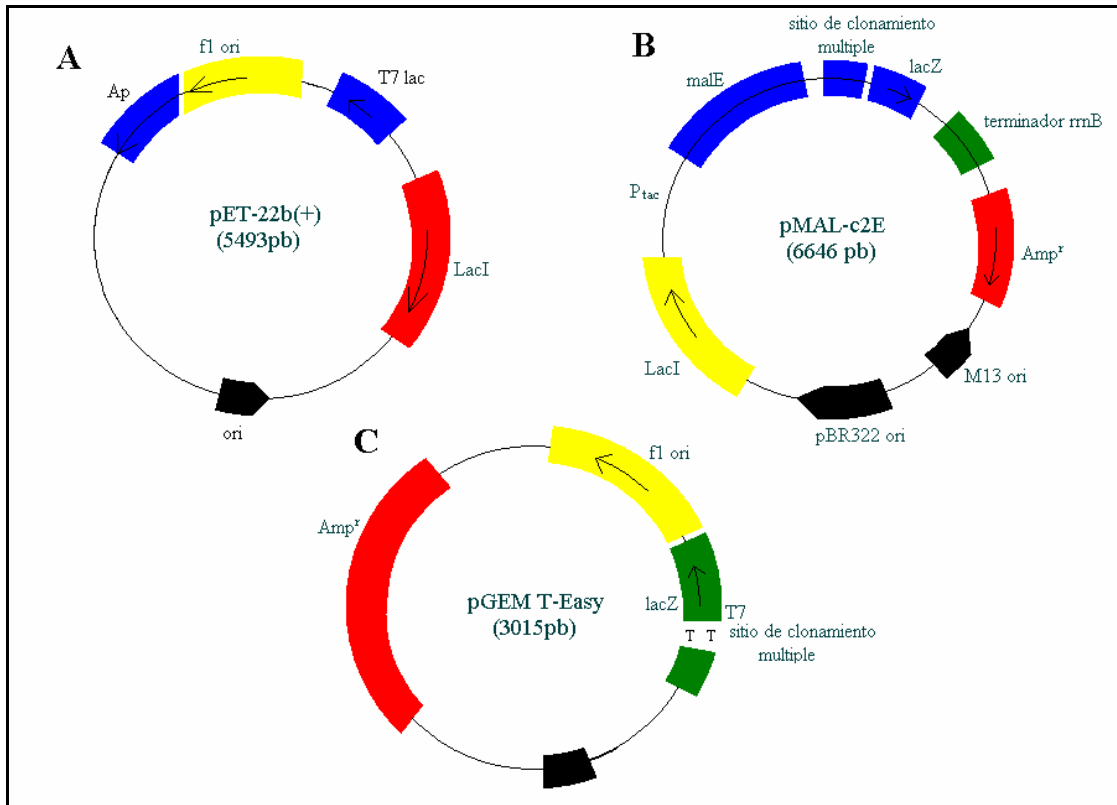
<b>Laboratorio</b>	<b>Reactivos</b>
Promega (WI-USA)	Enzimas de restricción <i>Hind</i> III, <i>Eco</i> RI, <i>Bam</i> HI y <i>Xba</i> I. <i>Taq</i> DNA polimerasa, pGEM-T Easy.
Invitrogen (CA-USA)	T4 DNA ligasa, estándar de tamaño molecular 100 Kpb, dNTPs, cepa <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .
Sigma (MO-USA)	X-GAL, IPTG, goma arábica, <i>p</i> -NFP, perlas de vidrio, Fast Garnet GBC.
Fermentas	Estándar de tamaño molecular preteñido de proteínas, enzimas de restricción <i>Nco</i> I, <i>Kpn</i> I.
Difco (DT- USA)	Triptona, extracto de levadura, medio LB, agar.
New England Biolabs (MA-USA)	pMAL-c2E, cepa <i>E. coli</i> TB1, resina de amilasa.
Novagen, Madison (WI-USA)	pET22b(+), <i>E. coli</i> BL21(D3E), enteroquinasa.
Qiagen	Los sistemas de purificación de productos de PCR, de DNA plasmidial y de extracción de DNA desde geles de agarosa.
Winkler	Tris, glicina, SDS, glicerol.
J.T Backer	Cloruro de sodio y ácido bórico.
Fermelo	Agarosa.
Merk	El resto de las sales, ácidos, bases, bromuro de etidio y solventes de grado analítico o de biología molecular.

### 2.1.3 Vectores de clonamiento y expresión

El vector de clonamiento pGEM-T Easy se caracteriza por poseer una timidina en el extremo 3' de cada una de las hebras en el sitio de inserción lo que permite la ligación de segmentos de DNA obtenidos por PCR que tienen una adenina en el extremo 3' de cada hebra debido a la acción de la *Taq* DNA polimerasa. Como sistema promotor, este vector utiliza los promotores de la RNA polimerasa T7 y SP6 que flanquean un sitio de clonamiento múltiple (Figura 3A).

Para la expresión de las proteínas recombinantes en *E. coli* se utilizaron dos vectores: pMAL-c2E y pET-22b(+). En el vector pMAL-c2E el gen clonado se inserta en el sitio múltiple de clonamiento río abajo del gen *malE*, que codifica para la proteína de unión a maltosa (MBP), lo que resulta en la expresión de una proteína de fusión a MBP. Esto permite la estabilización de la proteína y su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad. La proteína de fusión es fácilmente purificada por métodos que implican la afinidad de la proteína por la maltosa. El vector también contiene una secuencia Asp-Asp-Asp-Asp-Lys que codifica para el reconocimiento de la proteasa enteroquinasa, localizada justo en el extremo 5' del sitio de clonamiento múltiple, lo que permite cortar la MBP de la proteína de interés luego de su purificación. El vector pMAL-c2E tiene una delección en la secuencia señal *malE*, lo que resulta en la expresión citoplasmática de la proteína de fusión (Figura 3B).

El vector pET-22b(+) produce una proteína recombinante unida por su extremo C-terminal a un péptido de 6 histidinas que permite su posterior purificación. Además contiene una secuencia señal N-terminal *pelB* para una potencial localización periplasmática de la proteína. Utiliza el sistema promotor T7 (Figura 3C).



**Figura 3. Vectores de clonamiento y expresión.**

(A) Vector pET-22b(+), (B) vector pMAL-c2E y (C) vector pGEM-T Easy. Ori pBR322: origen de replicación bacteriano derivado de pBR322; M13 ori: origen de replicación de DNA de hebra simple derivado del bacteriófago M13; F1 ori: origen de replicación de DNA de hebra simple derivado del bacteriófago F1. Amp<sup>r</sup>: gen de resistencia a ampicilina; T7: promotor para T7 polimerasa; LacI: gen que codifica el represor *lac*; *P<sub>tac</sub>*: control del promotor híbrido *tac*; codón de inicio *lacZ*, región codificante para la β-galactosidasa interrumpida por el sitio de clonamiento; *malE*: secuencia codificante para la proteína MBP. *Ap*: secuencia codificante para *bla* contiene la región codificante para la β-galactosidasa interrumpida por el sitio de clonamiento.



#### **2.1.4 Medios de cultivo líquidos**

A continuación se describe la composición de los medios de cultivo utilizados.

##### **2.1.4.1 Medio marino 2216**

El medio agar marino 2216 (Difco), contiene por cada 1 L de solución: 5 g de triptona, 1 g de extracto de levadura, 0,1 g de citrato férrico, 19,45 g de cloruro de sodio, 8,8 g de cloruro de magnesio, 3,24 g de sulfato de sodio, 1,8 g de cloruro de calcio, 0,55 g de cloruro de potasio, 0,16 g de bicarbonato de sodio, 0,08 g bromuro de potasio, 0,034 g de cloruro de estroncio, 0,022 g de ácido bórico, 0,004 g de silicato de sodio, 0,0024 g de fluoruro de sodio, 0,0016 g de nitrato de amonio y 0,008 g de fosfato disódico. El volumen se llevó a 1 L con agua Milli-Q. El pH se ajustó a 7,6, se esterilizó por autoclave y se almacenó a temperatura ambiente.

##### **2.1.4.2 Medio SOB**

El medio SOB contiene por cada 1 L de solución: 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 0,5 g de cloruro de sodio. El volumen se llevó a 985 mL con agua Milli-Q. Se mezcló y se agregó 10 mL de una solución de cloruro de potasio 250 mM y se ajustó el pH a 7. Se esterilizó mediante autoclave. Antes de utilizar se agregó 5 mL de una solución estéril de cloruro de magnesio 2 M.

#### **2.1.4.3 Medio Luria-Bertani**

El medio LB contiene por cada 1 L de solución: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de cloruro de sodio. El volumen se llevó a 1 L con agua Milli-Q y el pH se ajustó a 7. Se esterilizó por autoclave y almacenó a temperatura ambiente.

#### **2.1.4.4 Medio TB**

El medio TB contiene por cada 1 L de solución: 12 g de triptona, 24 g de extracto de levadura y 4 mL de glicerol. El volumen se llevó a 900 mL con agua Milli-Q, se esterilizó por autoclave y se agregó 100 mL de fosfato de potasio estéril.

#### **2.1.4.5 Medio rico con glucosa y ampicilina**

Por cada litro de solución contiene: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de cloruro de sodio y 2 g de glucosa. El volumen se llevó a 1 L con agua Milli-Q. Se esterilizó por autoclave y antes de utilizar se le agregó ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL.

#### **2.1.5 Medios de cultivo sólidos**

Para la preparación de placas con medio sólido se agregó a los medios líquidos agar al 1,5% p/v. Los antibióticos se esterilizaron por filtración antes de ser agregados al medio de cultivo.

##### **2.1.5.1 Placas de agar con rodamina B-aceite de oliva**

Se preparó una solución stock de rodamina B 1 mg/mL en agua Milli-Q, se esterilizó por filtración utilizando un filtro con un tamaño de poro de 0,2 µm. Se preparó

medio agar marino 2216 al 1% p/v agar, se esterilizó por autoclave y se enfrió hasta alcanzar una temperatura de 60°C. Se mezcló con aceite de oliva 2,5% p/v y rodamina B 0,001% p/v, mediante un homogeneizador (Omni-Mixer, Omni International, CT-USA) durante 1 min. La mezcla se dejó a 60°C en un baño termoregulado (Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra) por 10 min con el fin de reducir la espuma, para luego colocar 20 mL de mezcla en placas de Petri plásticas estériles.

#### **2.1.6 Soluciones Stock**

- IPTG 0,1 M: Se preparó una solución stock de IPTG 0,1 M en agua Milli-Q estéril. Se esterilizó por filtración mediante un filtro con un tamaño de poro de 0,2 µm (Sartorius, Hannover-Alemania). Se almacenó a 4°C.
- XGal 50 mg/mL: Se preparó una solución stock de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactosido (XGal) a una concentración de 50 mg/mL en N,N'- dimetil-formamida. Se almacenó a -20°C.
- Ampicilina 100 mg/mL: Se preparó una solución stock de ampicilina a una concentración de 100 mg/mL en agua Milli-Q estéril. Se esterilizó por filtración utilizando un filtro estéril con un tamaño de poro de 0,2 µm. Se almacenó a -20°C en volúmenes pequeños.

## **2.2 Métodos**

### **2.2.1 Cultivo de microorganismos**

#### **2.2.1.1 Crecimiento y mantención de microorganismos**

Las cepas de *E. coli* BL21(DE3), TB1 y DH5 $\alpha$  stock se crecieron en placas con medio LB-agar a 37°C durante 16 h y mantenidas a 4°C por períodos menores a 30 días. Las bacterias de origen marino antártico se crecieron en placas con medio marino 2216-agar, a 4°C y se mantuvieron a esta misma temperatura.

#### **2.2.1.2 Crecimiento de cepas en cultivos líquidos**

Las cepas de *E. coli* se inocularon en los medios correspondientes. Suplementado con el antibiótico requerido, se incubaron a 37°C en un agitador orbital (Max<sup>Q</sup> 4000, Barnstead, Lab-Line, Iowa, USA) hasta alcanzar la O.D. deseada. Las cepas de bacterias de origen marino antártico se crecieron en medio marino 2216 y la incubación se realizó a 4°C en un agitador orbital durante 4 días.

### **2.2.2 Selección de cepas productoras de lipasa**

La selección de cepas bacterianas productoras de lipasa se realizó según lo descrito por Kouker y Jaeger (1986) con algunas modificaciones. Se picaron 7 colonias de diferentes cepas bacterianas de origen marino antártico sobre placas de agar con rodamina B-aceite de oliva. Las cepas productoras de lipasas se identificaron luego de 72 horas de incubación a 4°C, por la aparición de halos naranjos fluorescentes alrededor

de las colonias luego de ser expuestas a radiación UV a 350 nm (espectrofotómetro UV/visible Ultrospec® 3000, Pharmacia Biotech Ltd., Cambridge, Inglaterra).

### **2.2.3 Extracción DNA genómico de bacterias**

Se utilizó el protocolo descrito por Sambrook & Russell. Las bacterias se crecieron en 15 mL de medio marino 2216 a 4°C con agitación. Luego de 4 días, las células se centrifugaron a 4.100 x g, durante 10 minutos a 4°C (centrífuga Sorvall® RC-28S y rotor F-28/50 Sorvall®, DuPont, CT, USA) y el precipitado se resuspendió en 1 mL de agua Milli-Q estéril. Se centrifugó a 13.000  $\bar{g}$  por 1 minuto (centrífuga Eppendorf 5403 de Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) y el precipitado se resuspendió en 200  $\mu$ L de Tritón X-100 SDS estéril. Se agregó 200  $\mu$ L de una mezcla fenol-cloroformo 1:1 más 0,3 g de perlas de vidrio (425-600  $\mu$ m). Se continuó con el protocolo descrito por Sambrook & Russell.

### **2.2.4 Determinación de pureza y concentración de DNA**

Se midió la absorbancia a 260 nm (O.D<sub>260</sub>) y a 280 nm (O.D<sub>280</sub>). Se hicieron diluciones de la muestra de DNA en agua Milli-Q hasta que la O.D<sub>260</sub> estuviera en el rango de absorbancia 0,1-1. La pureza se determinó utilizando como criterio de pureza la razón O.D<sub>260</sub>/O.D<sub>280</sub> mayor a 1,8. La concentración se determinó en base a la absorbancia a 260 nm según:  $\mu\text{g/mL DNA} = \text{O.D}_{260} \times 50 \times \text{factor de dilución}$ .

### **2.2.5 Diseño de Oligonucleótidos**

Todos los oligonucleótidos -partidores y adaptadores- se mandaron a sintetizar a Fermelo y Macrogen.

### 2.2.5.1 Diseño de partidores para la amplificación de un fragmento de gen de lipasa

El diseño de partidores para la amplificación de un fragmento de gen parcialmente codificante para lipasa, se realizó a partir de alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de lipasas y esterasas bacterianas activas a bajas temperaturas. Las secuencias se obtuvieron a partir de la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/>), y su alineamiento se realizó con los programas ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) y Omega 2.0 (Rainbow Sentinel/LM, Rainbow Technologies, inc.).

### 2.2.5.2 Diseño de partidores y adaptadores para la obtención de las secuencias río arriba y río abajo del gen de lipasa.

Los extremos 3' y 5' del gen codificante para lipasa fueron obtenidos mediante un método de *genome walking* estandarizado en el laboratorio (CIBYB, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile). Para éste se diseñaron partidores a partir de un fragmento del gen de lipasa y adaptadores específicos que se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Partidores y adaptadores para la obtención de las secuencias río arriba y río abajo del gen de lipasa.

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia (5'→ 3')</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>
LipasaF1	TTTTGTCATACGGTCTGTGCCCAAAC	69
LipasaF2	GACTATCGCATGGCTCCTGAATATCCAG	69
Lipasa1	GGCAATGCACCAAGTGAAGTGAATG	70
Lipasa2	TTTGGGCACAGACCGTATGACAAAAC	69
AdaptHindIIIR	AGCTAGTACTAGTCGACGCGTGGCCTAG	64
AdaptHindIII	CTAGGCCACGCGTCGACTAGTACTAGCTT	69
AdapF2	CACGCGTCGACTAGTACTAGCTT	65

### 2.2.5.3 Diseño de partidores para el clonamiento del gen de lipasa aislado en los vectores de expresión.

Basándose en el análisis de la secuencia obtenida del gen codificante para lipasa se diseñaron los partidores pMALLipF y pMALLipR con sitios de restricción *KpnI* y *HindIII*, respectivamente, que proporcionaron los extremos requeridos para clonar el gen finalmente en el vector pMAL-c2E. Asimismo se sintetizaron los partidores pET22LipF y pET22LipR con los sitios de restricción *NcoI* y *XhoI*, respectivamente, que permitieron clonar el gen finalmente en el vector pET-22b(+) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Partidores utilizados para la expresión del gen codificante para lipasa.

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia (5' → 3')</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>
pMALLipF	<b>GGTAC</b> CTATTTTACCAGTGCCA	54,5
pMALLipR	<b>AAGCTT</b> TCAGAGATTTGGCTC	53,2
pET22LipF	<b>CCATGG</b> CTATTTTACCAGTGC	54
pET22LipR	<b>CTCGAG</b> ATTTGGCTCATCAC	53,3

Los sitios de restricción aparecen destacados con negrita.

### 2.2.6 Amplificación de DNA mediante PCR

Se realizaron amplificaciones de material genético utilizando *Taq* DNA polimerasa en algunos casos y en otros *Elongasa*®. Ambos procedimientos se detallan a continuación.

#### 2.2.6.1 Amplificación de DNA con *Taq* DNA polimerasa

Las reacciones de PCR se realizaron en tubos Eppendorf de 600 µL esterilizados por autoclave. Para el PCR se mezclaron los siguientes componentes: *buffer* de PCR 10X (Tris/HCl 200 mM, KCl 500 mM, pH 8,4), MgCl<sub>2</sub> 4 mM, dNTPs 10 mM (2,5 mM de cada dNTP), 10 pmoles de cada partidor y 1 unidad de *Taq* DNA polimerasa. Se

completó el volumen a 20  $\mu\text{L}$  con agua Milli-Q estéril, o a 50  $\mu\text{L}$  cuando se quisiera purificar el producto de PCR a partir de un gel de agarosa. Los tubos se incubaron en un termociclador (modelo PTC-100 de MJ Research, Inc., MA-USA) y se sometieron al programa requerido, que incluía una etapa inicial de desnaturalización a 94°C, seguida por 30 ciclos de amplificación que incluían 3 etapas: 30 s a 94°C, 30 s a una temperatura específica dependiendo de la  $T_m$  de los partidores que se utilicen y una etapa de extensión de un minuto por cada kilobase de DNA que se quiera amplificar, lo que se hace a una temperatura de 72°C, que corresponde a la temperatura óptima para la función catalítica de la *Taq* DNA polimerasa. Finalmente se dan 5 minutos a 72°C. Para el PCR inespecífico se hizo una etapa previa a los 30 ciclos, de 5 ciclos con temperatura de apareamiento de 10°C menor. Éste PCR se diferencia del específico en que al tener 5 ciclos previos con una temperatura de apareamiento menor, los partidores son menos selectivos al momento de unirse al templado.

Los programas utilizados para cada PCR se detallan a continuación

- PCR utilizados para la amplificación de un fragmento de gen codificante para lipasa a partir del DNA genómico de bacterias psicrófilas:

Específico: 5 min a 94°C, 35 ciclos (30 s a 94°C, 30 s a 55°C, 30 s a 72°C), 5 min a 72°C.

Inespecífico: 5 min a 94°C, 5 ciclos (30 s a 94°C, 30 s a 45°C, 30 s a 72°C), 35 ciclos (30 s a 94°C, 30 s a 55°C, 30 s a 72°C), 5 min a 72°C.

- PCR de colonias: 5 min a 94°C, 30 ciclos (30 s a 94°C, 30 s a temperatura relativa a las  $T_m$  de los partidores, 30 s a 72°C), 5 min a 72°C.



- Amplificación del DNAr 16S: 3 min a 94°C, 40 ciclos (32 s a 94°C, 45 s a 50°C, 2 min a 72°C), 7 min a 72°C.

#### **2.2.6.2 Amplificación de DNA con Elongasa®**

En lugar de *Taq* DNA polimerasa, en algunos casos se utilizó Elongasa®. Esta enzima es capaz de amplificar fragmentos de mayor tamaño que la *Taq*, además de cometer menos errores durante la amplificación que esta última. Las reacciones de PCR se realizaron en tubos Eppendorf de 600 µL esterilizados por autoclave. El PCR consistió en 2 mezclas que hacían un volumen final de 50 µL. La mezcla 1 se preparó de acuerdo a: ambos partidores en una concentración de 5 pM cada uno, 150 ng de templado, 0,2 mM de cada dNTP, se completó el volumen con agua Milli-Q estéril hasta 20 µL. La mezcla 2 consistió de: *buffer* A 5X y *buffer* B 5X para una concentración final de Tris-SO<sub>4</sub> 60 mM (pH 9,1), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 18 mM y MgSO<sub>4</sub> 1,9 mM, 1 µL de mezcla de enzima Elongasa®, se completó el volumen con agua Milli-Q estéril hasta 30 µL. Se puso la mezcla 1 por 30 segundos a 94°C en un termociclador (termociclador PTC-100 de MJ Research, Inc., MA-USA), luego se agregó la mezcla 2 y se siguió con el programa requerido. Los programas utilizados dependían del fragmento a amplificar. En general, comprendían una primera parte con 3 ciclos de amplificación que incluían 3 etapas: 30 s a 94°C, 30 s a una temperatura específica dependiendo de la T<sub>m</sub> de los partidores que se utilicen y una etapa de extensión de un minuto por cada kilobase de DNA que se quiera amplificar, lo que se hace a una temperatura de 68°C, correspondiente a la temperatura óptima para la función catalítica de la Elongasa®. En una segunda parte, se realizó con 25 ciclos de amplificación, que incluían las mismas

tres etapas de los primeros tres ciclos, pero con una temperatura de apareamiento diferente. Finalmente se dan 5 minutos a 72°C.

- Amplificación del gen codificante para lipasa con sitios de restricción en sus extremos: 5 min a 94°C, 3 ciclos (30 s a 94°C, 30seg a 48°C, 1 min 20 s a 68°C), 20 ciclos (30 s a 94°C, 30seg a 59°C, 1 min 20 s a 68°C), 5 min a 72°C.

### **2.2.7 Electroforesis de DNA**

Las electroforesis de DNA se realizaron en una cámara horizontal Horizon-58 (Gibco-BRL Life Technologies, Inc., MA-USA). Las muestras se mezclaron en proporción 5:1 con *buffer* de carga 6X (glicerol 30% p/v y azul de bromofenol 0,25% p/v) y luego se cargaron en geles de agarosa de una concentración ajustada al tamaño del fragmento de DNA que se espera observar. Estos se hicieron a concentraciones entre 0,8% p/v para tamaños de DNA genómicos, hasta 2,5% p/v para fragmentos de 150-300 pb. La agarosa se preparó en *buffer* TAE 1X: Tris-Acetato-EDTA (Tris 40 mM, acetato 20 mM y EDTA 1 mM) y bromuro de etidio 0,2 µg/mL. Se incluyó estándar de peso molecular de tamaño 1 Kpb. Las electroforesis se realizaron bajo voltaje constante de 100 V (fuente de poder Model 500 de BRL Life Technologies, Inc., MD-USA). Se utilizó como *buffer* de corrida TAE 1X. Finalmente se observó el gel sobre un transiluminador UV y se fotografió.

### **2.2.8 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa**

Con el fin de purificar fragmentos de DNA desde geles de agarosa, se cortó la banda de DNA del gel, minimizando el exceso de agarosa. Después se colocó en un tubo

Eppendorf de 1,6 mL esterilizado por autoclave, para luego utilizar el sistema QIAEX II Gel Extraction, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Finalmente, el DNA se eluyó en agua Milli-Q estéril a pH 8, previamente calentada a 50°C.

### **2.2.9 Ligación de fragmentos de DNA en vectores de clonamiento y expresión**

Para la reacción de ligación se utilizó como inserto los productos PCR purificados desde geles de agarosa. Éstos se ligaron a vectores de clonamiento o expresión dependiendo del interés. A continuación se detallan los procedimientos.

#### **2.2.9.1 Ligación en el vector de clonamiento pGEM-T Easy**

La mezcla de reacción se hizo en un volumen final de 10 µL y contenía *buffer* de ligación 2X, 50 ng de vector pGEM-T Easy, 3,5 µL de inserto y 1 unidad de enzima T4-DNA ligasa. Se dejó ligando por 16 h a 4°C ó 1 h a temperatura ambiente. El producto de ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5α electrocompetentes.

#### **2.2.9.2 Ligación en los vectores de expresión pET22b(+) y pMAL-c2E**

La reacción de ligación se realizó en un volumen final de 10 µL en una mezcla que contenía 100 ng de vector digerido, 300 ng de inserto digerido con las mismas enzimas de restricción, *buffer* T4 DNA ligasa 5X (Tris/HCl 250 mM pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, ATP 5 mM, DTT 5 mM, polietilenglicol-8000 25% p/v) y 1 µL de T4 DNA ligasa. La mezcla de reacción se dejó a 16°C por 16 h.

### **2.2.10 Preparación de células electrocompetentes**

La preparación de células electrocompetentes de *E. coli* BL21(DE3), TB1 ó DH5 $\alpha$  se realizó de la misma forma. Se inocularon 10 mL de medio SOB con una colonia de la cepa requerida y se creció con agitación a 37°C durante 16 h. Se midió la densidad óptica O.D del cultivo a 620 nm, utilizando como blanco medio estéril y se determinó el volumen requerido para inocular 1 L de medio estéril a una O.D<sub>620</sub> final de 0,05. Luego de 2-4 h se midió la O.D<sub>620</sub> hasta alcanzar un valor entre 0,6 y 0,8. El cultivo se enfrió en hielo durante 10 min y se centrifugó a 5.000 x  $\bar{g}$  y a 4°C durante 10 min (centrífuga Sorvall® RC-28S y rotor GS-3 Sorvall®, DuPont, CT, USA). El precipitado se lavó 4 veces con glicerol 10% v/v estéril. Luego del último lavado, el precipitado se resuspendió en el residuo de glicerol, para finalmente ser alicuotado en volúmenes precisos para su utilización (entre 25 y 100  $\mu$ L). Las células electrocompetentes fueron mantenidas a -80°C.

### **2.2.11 Transformación de células electrocompetentes**

Sobre 20  $\mu$ L de células electrocompetentes *E. coli* BL21(DE3), TB1 ó DH5 $\alpha$  se agregó 1  $\mu$ L de mezcla de ligación. La electroporación se realizó en un equipo Cell-Porator® Electroporation System (Gibco-BRL Life Technologies, Inc., MD-USA) en las siguientes condiciones: 420V, 330 $\mu$ F, baja impedancia, una tasa de carga rápida y un tiempo máximo de 2,5 mseg. Las células transformadas se mezclaron con 1 mL de medio LB y se incubaron a 37°C durante 1 h y con agitación de 200 rpm. Luego se centrifugó a 13.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5403 de Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) durante 1 min y se descartaron 850  $\mu$ L del sobrenadante. El precipitado se

resuspendió en el sobrenadante remanente y se plaqueó sobre placas de LB agar estériles que contenían ampicilina 100 µg/mL, X-gal 50 µg/mL e IPTG 1 mM. Las placas de transformación se incubaron a 37°C durante 16 h. Para su mantención se conservaron a 4°C.

### **2.2.12 PCR de Colonias**

El PCR de colonias se realizó para corroborar la presencia de inserto en las colonias blancas seleccionadas como clones positivos. Las colonias blancas seleccionadas se transfirieron mediante una punta estéril desde la placa de transformación a las placas grillas de LB agar suplementadas con ampicilina, IPTG y X-gal y a un tubo Eppendorf con 100 µL de agua Milli-Q estéril. La suspensión (tubo Eppendorf) se incubó a 100°C durante 10 min y se tomaron 5 µL, los que se agregaron sobre 15 µL de mezcla de PCR. La presencia de inserto se confirmó utilizando los partidores respectivos que amplificaron el fragmento clonado, para el cual se utilizó el protocolo de PCR descrito en la sección 2.2.6.1. Los productos de PCR de colonias se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% p/v.

### **2.2.13 Minipreparación de DNA plasmidial**

El DNA plasmidial se extrajo a partir de un cultivo en 4 mL de medio LB incubado por 16 h a 37°C y 200 rpm. El cultivo se centrifugó a 13.000 x  $\bar{g}$  (centrífuga Eppendorf 5403 de Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) por 1 min en un tubo Eppendorf de 1,6 mL previamente esterilizado por autoclave. El proceso se repitió hasta completar los 4 mL necesarios para obtener un precipitado de bacterias. A continuación,

se utilizó el sistema QIAprep Spin Miniprep Kit. La extracción se realizó según las instrucciones del fabricante.

#### 2.2.14 Digestión de DNA con enzimas de restricción

Todas las enzimas de restricción utilizadas en esta tesis producen cortes de tipo cohesivos. Estas se resumen en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Enzimas de restricción utilizadas durante el trabajo de tesis.

<b>Enzima</b>	<b>Sitio de reconocimiento (5' → 3')</b>
<i>EcoRI</i>	GAATTC
<i>HindIII</i>	AAGCTT
<i>KpnI</i>	GGTACC
<i>NcoI</i>	CCATGG
<i>XhoI</i>	CTCGAG
<i>XbaI</i>	TCTAGA
<i>BamHI</i>	GGATCC

##### 2.2.14.1 Digestión de DNA plasmidial

La enzima *EcoRI* se utilizó para corroborar la presencia de insertos ligados en pGEM T-Easy. *KpnI* y *HindIII* se utilizaron para digerir el vector pMAL-c2E, ya sea para su linealización o para escindir insertos ligados en él. *NcoI* y *XhoI* se usaron para digerir el vector pET22b(+), para su linealización o para recuperar insertos ligados en él. La reacción de digestión final era de 20 µL y contenía 2 µL de *buffer 5X* recomendado por el proveedor (Tabla 1), 1 µL de enzima o las unidades indicadas por el proveedor y 100 ng de vector para el caso de pGEM T-Easy con inserto. Para el caso de la linealización, se utilizó 500 ng de los vectores de expresión y para los vectores de expresión más el inserto, se ocupó 1,5 µg. La mezcla se llevó al volumen final con agua Milli-Q estéril. Para las digestiones dobles se utilizó el *buffer* recomendado por *New*

*England Biolabs* y 1  $\mu\text{L}$  de cada enzima. Se dejó reaccionando durante 2 h a 37°C y el resultado se analizó mediante un gel de agarosa.

#### **2.2.14.2 Digestión de DNA genómico**

Para digerir el DNA genómico, se realizaron pruebas con las siguientes enzimas por separado: *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III y *Xba*I. La reacción se hizo en el *buffer* de reacción recomendado por el proveedor para cada enzima. La reacción de digestión se efectuó en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  que contenía 1  $\mu\text{g}$  de DNA previamente purificado, 2  $\mu\text{L}$  de *buffer* 10X y 0,5  $\mu\text{L}$  de enzima. El resto del volumen se completó con agua Milli-Q estéril. La mezcla se incubó a 37°C por 2 h.

La reacción de digestión final con la enzima *Hind*III fue de 50  $\mu\text{L}$  y contenía 4  $\mu\text{g}$  de DNA previamente purificado, 5  $\mu\text{L}$  de *buffer* 10X y 40 unidades de enzima. El volumen final de reacción se completó con agua Milli-Q y la mezcla se incubó a 37°C por 2 horas.

#### **2.2.15 Secuenciación de DNA y análisis de secuencia**

El DNA plasmidial se mandó a secuenciar a Macrogen S.A (Korea). Las secuencias se corrigieron utilizando el programa Omega 2.0 (Rainbow Sentinel/LM, Rainbow Technologies, inc.). Estas se analizaron comparándolas con otras secuencias descritas en las bases de datos de *GenBank*, nr, mediante el algoritmo BLASTn, BLASTp o BLASTx (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>), que comparan la secuencia nucleotídica, la secuencia aminoacídica o la secuencia nucleotídica traducida en todos sus marcos de lectura contra una base de datos respectivamente (Altschul y col., 1997).

Para obtener el marco de lectura abierto (ORF) se utilizó en el programa Omiga la herramienta de búsqueda de los ORF y de referencia las secuencias de motivos bacterianos.

#### **2.2.16 Amplificación del DNAr 16S**

Los genes que codifican para la secuencia RNAr 16S (DNAr 16S) son altamente conservados en bacterias. Con el objetivo de conocer el género al cual pertenece la cepa bacteriana 2-17, se hizo un análisis del DNAr 16S. Para esto se amplificó un fragmento del DNAr 16S realizando un PCR según lo descrito en la sección 2.2.6.1. Se utilizó como templado el DNA genómico de la cepa 2-17 y unos partidores especialmente diseñados para eso. Estos fueron diseñados y facilitados por el laboratorio de BioHidroMetalurgia del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile.

Sus secuencias son: Sentido 5'-AGCTAGTTGGTAGGGTAAAG-3' y Antisentido 5'-CCGCGATTACTAGCGATTCC-3').

#### **2.2.17 Construcción de árboles filogenéticos para análisis 16S y proteína lipasa**

Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizaron dos programas computacionales. El primero, BioEdit versión 7.0.0 (Hall, 1999), es un programa editor de secuencias que se utilizó para alinear las secuencias y luego realizarles un análisis filogenético. Para ver el árbol filogenético se utilizó el programa TreeView versión 1.6.6 (Page, 1996). Este programa permite abrir archivos obtenidos a partir de BioEdit.



Para la construcción del árbol filogenético 16S se alinearon 30 secuencias de DNAr 16S de diferentes especies pertenecientes al orden *Pseudomonadales*, obtenidas a partir de la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov>). Se eligió este orden porque al analizar la secuencia obtenida del DNAr 16S de la cepa 2-17 mediante el algoritmo Blastn (Altschul y col., 1997), se obtuvo un 99% de identidad con el gen codificante para el DNAr 16S de bacterias del género *Psychrobacter*, las cuales pertenecen al orden *Pseudomonadales*. Este orden abarca a las familias *Moraxellaceae* y *Pseudomonadaceae*, las que a su vez contienen a los géneros *Acinetobacter*, *Alkanindiges*, *Enhydrobacter*, *Moraxella* y *Psychrobacter* para la familia *Moraxellaceae* y *Cellvibrio* y *Pseudomona* para la familia *Pseudomonadaceae*. Luego del alineamiento mediante ClustalW, utilizando el programa BioEdit, se aplicó la herramienta “DNADist→ Neighbor phylogenetic tree”. Finalmente el árbol fue visualizado utilizando TreeView, abriendo el archivo temporal del árbol arrojado por el programa anterior. La escala de la barra presente en el árbol filogenético representa el número de sustituciones nucleotídicas por sitio.

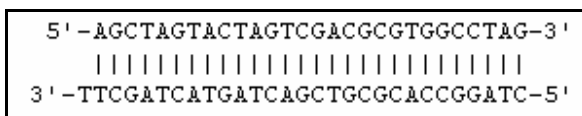
Para la construcción del árbol filogenético de las proteínas lipasas se alinearon las 20 primeras secuencias aminoacídicas de lipasas de origen bacteriano obtenidas de la base de datos de *GenBank*, nr (<http://www.ncbi.nih.gov>), al hacer un análisis Blast Psi (Altschul y col., 1997, Schäffer y col., 2001) a la secuencia de lipasa conseguida a partir de la cepa 2-17. Luego del alineamiento mediante ClustalW, utilizando el programa BioEdit, se aplicó la herramienta “ProtDist→ Neighbor phylogenetic tree”. Finalmente el árbol fue visualizado de la misma manera que para el árbol filogenético 16S.

## 2.2.18 Búsqueda de las secuencias río arriba y río abajo del gen codificante para lipasa.

Con el fin de encontrar la secuencia del gen completo, se estandarizó una técnica de *genome walking* en el laboratorio. Esta técnica consiste en 4 etapas cortas: i) la construcción de un oligo-adaptador de doble hebra que contiene una timidina no apareada en un extremo 3', ii) digestión del DNA genómico con la enzima de restricción deseada y luego elongar los fragmentos producidos mediante el uso de la *Taq* DNA polimerasa con el fin de agregar una adenina a los extremos 3' de cada fragmento, iii) ligación del oligo-adaptador con los fragmentos de DNA generando así una genoteca-adaptador y iv) amplificación final del gen. Estos pasos se detallan a continuación y con un diagrama en la Figura 5.

### 2.2.18.1 Construcción del oligo-adaptador

Se construyó un oligo-adaptador que contiene 6 sitios de restricción, alineando dos oligonucleótidos, AdaptHindIII y AdaptHindIIIR, para formar el adaptador de doble hebra AdaptHindIIItotal (Figura 4).



**Figura 4.** AdaptHindIIItotal.

Se construyó un oligo-adaptador que contiene una timidina no apareada en uno de sus extremos 3'.

Este se realizó hirviendo a “baño María” una solución 10  $\mu$ M de estos oligonucleótidos, seguido de un enfriamiento lento hasta alcanzar una temperatura ambiente ( $\sim 20^{\circ}\text{C}$ ). A partir de la secuencia de este oligo-adaptador se diseñó un partidor específico AdapF2 (Tabla 2), que se une a una región en AdaptHindIIItotal para amplificar el DNA ligado al oligo-adaptador.

#### **2.2.18.2 Construcción de la genoteca-adaptador**

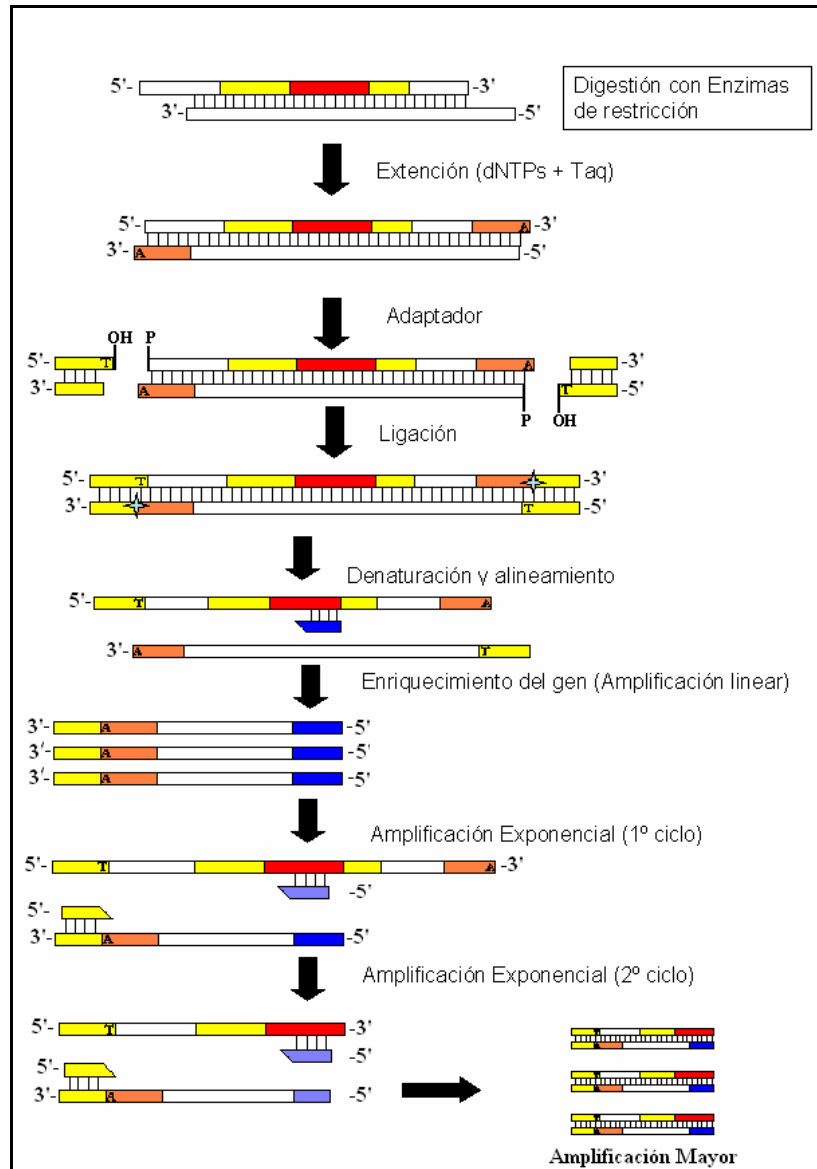
Para la construcción de la genoteca-adaptador, que corresponde al DNA digerido unido al adaptador en sus extremos, se digirió el DNA genómico con la enzima de restricción *HindIII*, como se indica en la sección 2.2.14.2. Posteriormente, para extender los extremos 3' de los fragmentos y agregar una adenina no apareada, se tomaron 500 ng del DNA digerido y purificado, se hizo reaccionar con 5 unidades de *Taq* DNA polimerasa en una mezcla de PCR de 20  $\mu$ L sin partidores y se puso a reaccionar a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 45 min. Luego se tomaron 7  $\mu$ L de esta reacción y se mezclaron con 15 pmoles del adaptador AdaptHindIIItotal para realizar la reacción de ligación con una unidad de T4 DNA ligasa en 10  $\mu$ L de volumen de reacción. Esta reacción se incubó a  $16^{\circ}\text{C}$  por 16 h.

#### **2.2.18.3 Elongación y amplificación de los extremos 3' y 5' del gen de lipasa**

A partir de la genoteca-adaptador diluida 10 veces se elongaron los fragmentos utilizando el partidor LipasaF1 (Tabla 2) para obtener la secuencia río abajo o extremo 3' y Lipasa1 para conseguir la secuencia río arriba o extremo 5'. La mezcla del PCR se

detalla en la sección 2.2.6.2, pero con un solo partidor. El programa utilizado consistió en 20 ciclos de 94°C por 30 seg, 68°C por 5 min y un ciclo adicional de 7 min a 68°C.

El producto de PCR de esta primera amplificación fue diluido 10 veces y 3 µl de este fueron usados como templado en el segundo PCR, que busca amplificar el extremo 3' y 5' del gen de lipasa. La mezcla del PCR se explica en la sección 2.2.6.2. Para este PCR las condiciones fueron 35 ciclos de 94°C por 30 s y 68 °C por 5 min y un ciclo adicional a 68 °C por 7 min. En este PCR, para la obtención del extremo 3', se utilizó como partidor sentido LipasaF2 y como partidor antisentido Adapf2. Para la obtención del extremo 5' se utilizó como partidor sentido AdapF2 y como partidor antisentido Lipasa2.



**Figura 5.** Diagrama de técnica de genome walking empleada para la obtención de las secuencias río arriba y río abajo del gen de lipasa.

Se detalla paso a paso la técnica utilizada. Luego de digerir el DNA genómico con *HindIII*, este se extiende con *Taq* DNA polimerasa aprovechando su capacidad de dejar una adenina en el extremo 3'. Luego se liga el adaptador *AdaptHindIII*total que contiene una timidina desapareada. Mediante un PCR se realiza un enriquecimiento de un extremo del gen utilizando el partidor 1 diseñado para dicho fin. Finalmente se realiza un segundo PRC con un partidor 2 diseñado a partir del fragmento de lipasa que se encuentra más adentro que el partidor 1 y *AdapF2* que se une a una región en *AdaptHindIII*total.

### 2.2.19 Hibridación Southern

Se realizó según lo descrito por Sambrook & Russell, con algunas modificaciones.

#### Marcaje de sonda

Como sonda para la hibridación southern se utilizó el fragmento de gen de lipasa de 240 pb obtenido en un principio. Se amplificó por PCR utilizando los partidores LF1 y LR2 en un volumen final de 200  $\mu$ L de mezcla de PCR. El programa utilizado fue el descrito en la sección 2.2.6.1 correspondiente al PCR inespecífico. El fragmento amplificado se corrió mediante una electroforesis y se purificó desde el gel de agarosa. Se utilizó el sistema *BioPrime DNA Labeling* de Invitrogen para marcar la sonda con biotina, siguiendo las instrucciones del proveedor.

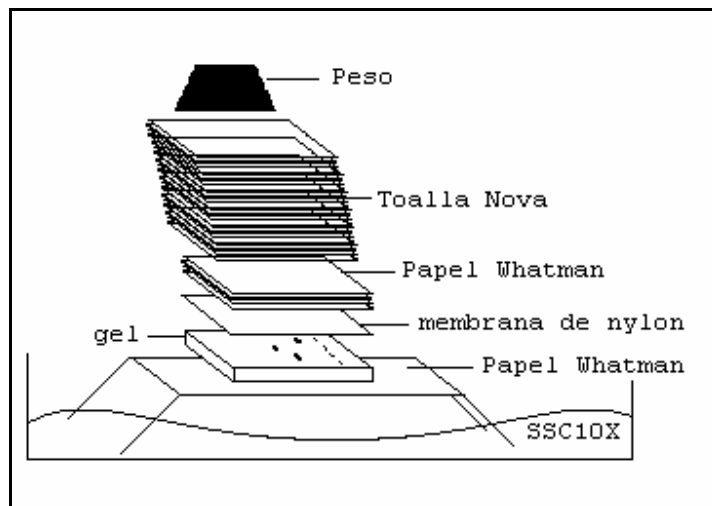
Para corroborar que la sonda haya quedado bien marcada se utilizó el sistema de detección *Phototope-Star Detection* de *New England BioLabs* y se siguió con el protocolo según lo recomendado por el proveedor. Para esto se prepararon las siguientes soluciones en agua Milli-Q: solución de bloqueo: SDS 5% p/v, fosfato de sodio 25 mM ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  17 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  8 mM), NaCl 125 mM pH 7,2, solución de lavado I: SDS 0,5% p/v, fosfato de sodio 2,5 mM ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,7 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,8 mM), NaCl 12,5 mM, pH 7,2 y solución de lavado II: Tris/HCl 10 mM, NaCl 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, pH 9,5. Para la detección se puso la membrana en una bolsa de hibridación, la que luego se empapó en el reactivo del *kit* diluido 200 veces en agua Milli-Q y se incubó durante 5 min. Pasado este tiempo se secó y se le colocó el sustrato a 37°C en oscuridad. Luego de 5 minutos se sacó todo el sustrato de la membrana, se removieron todas las burbujas de

la bolsa de hibridación y se reselló. Se expuso a una película de rayos-X durante toda la noche y al día siguiente se reveló.

### Transferencia

Se corrió un gel de agarosa durante 4 h a 50V con la digestión del DNA genómico. Posteriormente se lavó el gel 2 veces durante 15 min con solución desnaturante (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M), 15 minutos con agua destilada, 2 veces durante 20 min con una solución de neutralización (Tris/HCl 250 mM, NaCl 750 mM, pH 7,7) y 2 veces durante 15 min con agua destilada.

La transferencia se realizó en una cámara colocando sobre el gel una membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra) y sobre ella, varios pedazos de papel cromatográfico (Whatman 3 mm), del mismo tamaño del gel. La transferencia se realizó durante toda la noche con solución SSC 10X (Figura 6).



**Figura 6.** Transferencia del DNA desde el gel a la membrana de nylon.

La transferencia se realizó en una cámara colocando el gel sobre papel Whatman que tocara la solución de SSC 10X y sobre éste una membrana de nylon.

Al terminar la transferencia, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (1 µg/mL) en *buffer* TAE 1X y se fotografió para ver si aún quedaba DNA sin transferir. La membrana se colocó sobre papel Whatman empapado en SSC 5X que estaba sobre papel Whatman seco. Con el fin de fijar el DNA a la membrana, ésta se expuso a luz UV de una longitud de onda de 254 nm durante 90 seg, para lo cual se utilizó un transiluminador.

#### Prehibridación

Se realizó en una botella de prehibridación a 65°C. Se prepararon 15 mL de solución de prehibridación que contenía SSC 5X, SDS 10 g/L y Denhardt's 5X, se precalentó a 65°C y se agregó espermio de salmón 100 µg/mL (stock 10 mg/mL). La botella con la membrana y la solución de prehibridación se colocó en un rotor (Labquake, Equilab) con un contrapeso en una estufa de incubación a 65°C durante 1 h.

#### Hibridación

Se retiró la solución de prehibridación de la botella y se cambió por solución de hibridación previamente calentada a 65°C (solución de prehibridación fresca más 20 ng/mL de sonda marcada). Luego se colocó en una estufa de incubación a 65°C en un rotor con un contrapeso durante 16 h. La solución de hibridación se guardó para su posterior uso a -20°C.

#### Posthibridación

Se sacó el exceso de solución de hibridación y se lavó a temperatura ambiente con SSC 2X-SDS 1% p/v durante 5 min y SSC 2X-SDS 0,1% p/v durante 15 min. Después se lavó a 65°C con SSC 2X-SDS 0,1% p/v durante 30 min en el rotor. El último lavado se hizo a temperatura ambiente con SSC 0,5X durante 1 min. Se sacó la



membrana de la botella de hibridación y se sacó la mayor cantidad de líquido de esta, poniendo una punta en toalla de papel.

### Detección

Se colocó la membrana en un frasco de vidrio y se procedió con el sistema de detección Phototope-Star Detection de New England BioLabs, al igual que la corroboración del marcaje de sonda. Se siguió con el protocolo según lo recomendado por el proveedor. insaciable

#### **2.2.20 Análisis de la secuencia río arriba del gen codificante para lipasa**

Como se obtuvo la secuencia río arriba del gen de lipasa mediante el método de *genome walking*, ésta se analizó. Con el fin de buscar una posible región promotora del gen se realizó un alineamiento con 11 regiones previamente reportadas pertenecientes a *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 (Duilio y col., 2004), que son los únicos promotores descritos para bacterias psicrófilas. Así, se realizó la búsqueda en toda la secuencia de DNA obtenida río arriba del codón de inicio de la traducción, incluyendo éste último, que suman 598 nucleótidos (material complementario 7.2). Para el alineamiento se utilizó el programa BioEdit (Hall, 1999).

#### **2.2.21 Obtención de proteínas recombinantes en *E. coli***

La inducción de la síntesis de la proteína recombinante se realizó mediante dos sistemas de expresión diferentes en *E. coli*: BL21(D3E)/pET22b(+) y TB1/pMALc2E.

### **2.2.21.1 Inducción de la síntesis de proteínas recombinantes mediante el sistema de expresión *E. coli* BL21(D3E)/pET22b(+)**

El gen codificante para lipasa aislado se expresó en células *E. coli* BL21(DE3) electrocompetentes previamente transformadas con el vector recombinante pETLip. Para inducir la expresión del gen en pET22 se procedió según lo recomendado por el “manual del sistema pET”. Así, se inocularon 20 mL de medio TB más glucosa (sección 2.1.4.4) con una colonia de células BL21(D3E) recombinantes con el vector pETLip. El inóculo se dejó creciendo a 37°C con agitación de 200 rpm por 16 h. Al día siguiente se midió la densidad óptica a 620 nm ( $OD_{620}$ ) y se determinó el volumen necesario para inocular 250 mL de medio TB más glucosa con el cultivo de noche para una  $OD_{620}$  inicial de 0,05 nm. El cultivo se creció con agitación a 37°C hasta alcanzar una  $OD_{620}$  de 0,6 en aproximadamente 2 h, se tomó una muestra de 1 mL, se centrifugó (centrífuga Eppendorf 5403 de Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) y el precipitado se resuspendió en 100  $\mu$ L de *buffer* SDS-PAGE 5X para luego guardarlo a -20°C (muestra1: células sin inducir). El resto del cultivo de células se enfrió en hielo durante 5 min y se centrifugó en una botella esterilizada por autoclave a  $5.000 \times \bar{g}$  durante 5 min (centrífuga Sorvall® RC-28S y rotor GS-3 Sorvall®, DuPont, CT, USA). El precipitado se resuspendió en 250 mL de medio TB estéril, se pasó a un matraz estéril y la inducción se hizo agregando IPTG para una concentración final de 0,5 mM. Se continuó la incubación a 20°C con agitación de 200 rpm. Pasadas 4 h se tomó una muestra de 500  $\mu$ L, se centrifugó y el precipitado se resuspendió en 200  $\mu$ L de *buffer* SDS-PAGE 5X

para después guardarlo a -20°C (muestra 2: células inducidas). El resto se utilizó para la purificación de la proteína recombinante.

#### **2.2.21.2 Inducción de la síntesis de proteínas recombinantes mediante el sistema de expresión *E. coli* TB1/pMALc2E**

El gen codificante para lipasa aislado se expresó en células *E. coli* TB1 electrocompetentes previamente transformadas con el vector recombinante pMALcLip. La inducción de la expresión del gen se realizó según lo recomendado por el manual de “Proteína de fusión pMAL y sistema de purificación” de *New England BioLabs* con algunas modificaciones. Se inocularon 20 mL de medio rico con glucosa y ampicilina (sección 2.1.4.5) con una colonia de células TB1 recombinantes con el vector pMALcLip. Se procedió igual que en el punto 2.2.20.1, aunque la inducción se realizó agregando IPTG de un stock 100 mM para una concentración final de 0,3 mM directamente al cultivo, que alcanzó una OD<sub>620</sub> de 0,6 sin cambiar su medio.

#### **2.2.21.3 Purificación de la proteína recombinante mediante el sistema de expresión *E. coli* BL21(D3E)/pET22b(+)**

Las células se recolectaron mediante centrifugación a 5.000 x  $\bar{g}$  por 5 min, en una botella de centrífuga previamente pesada (centrífuga Sorvall® RC-28S y rotor GS-3 Sorvall®, DuPont, CT, USA). Al sobrenadante se le midió la actividad lipolítica (sección 2.2.24.2). El precipitado se resuspendió en 8 mL/0,1gr peso húmedo de células, de una solución Tris/HCl 30 mM, sucrosa 20% p/v (pH 8). Se pasó a un vaso precipitado y se agregó EDTA para una concentración final de 1 mM. Se agitó utilizando una barra

magnética durante 10 min, para luego centrifugar a  $10.000 \times \bar{g}$  y  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 min (centrífuga Sorvall® RC-28S y rotor F-28/50 Sorvall®, DuPont, CT, USA). El precipitado se resuspendió en 60 mL de una solución fría de  $\text{MgSO}_4$  5 mM, se pasó a un vaso precipitado y se agitó con agitador magnético en baño de hielo. Luego de 10 min se centrifugó a  $10.000 \times \bar{g}$  y  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. Del sobrenadante, que corresponde a la fracción periplásmica, se tomó una muestra de 10  $\mu\text{L}$  y se agregó *buffer* SDS-PAGE 5X para luego guardarlo a  $-20^{\circ}\text{C}$  (muestra 3: fracción periplásmica sin purificar). El resto se dializó contra 1 L de *buffer Binding* ( $\text{NaCl}$  300 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, Imidazol 10 mM, pH 8) durante 16 h a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente, se cambió la solución y se continuó dializando durante 4 h a  $4^{\circ}\text{C}$  para posteriormente purificarlo por una columna con resina de níquel agarosa (Ni-NTA His-Bind, Novagen). Por otro lado, el precipitado que contiene tanto la fracción soluble como la insoluble, se resuspendió en *buffer Binding* y se agregó lisozima para una concentración final de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a partir de un stock fresco de 10 mg/mL en agua. Se incubó a  $30^{\circ}\text{C}$  y pasados 15 min, se enfrió en hielo durante 15 min para posteriormente sonicar la mezcla (Sonicador Microson, Equilab). Se sonicó con 10 pulsos de 30 s y se centrifugó a  $10.000 \times \bar{g}$  durante 15 min. El sobrenadante, que corresponde a la fracción soluble, se purificó por una columna con resina de níquel agarosa. El precipitado, que corresponde a la fracción insoluble, se disolvió en 10 mL de *buffer B* (urea 8 M, Tris/HCl 10 mM, *buffer* fosfato de sodio 100 mM, pH 8). Se agitó a temperatura ambiente. Luego de 30 min, se centrifugó a  $10.000 \times \bar{g}$  durante 20 min y el sobrenadante se purificó por una columna con resina de níquel agarosa.

Las fracciones periplásmica y soluble se purificaron por una columna con resina de níquel. La resina utilizada tiene alta afinidad por un segmento de polihistidina presente en la proteína de fusión. Se agregaron 250  $\mu$ L de resina de agarosa Ni-NTA a la fracción a purificar y se agitó durante 1 h en hielo. Se cargó lentamente en una jeringa de 10 mL (Nitro, Osaka, Japón) y se pasó por una columna de miniprep (Promega) con el fin de cargar la proteína unida a la resina. Se lavó con 4 volúmenes de columna (1 mL) con *buffer Binding* Imidazol 20 mM, se secó la columna mediante un *spin* y finalmente se eluyeron 2 fracciones con 250  $\mu$ L de *buffer Binding* 250 mM imidazol. Por otro lado, la fracción insoluble también se purificó por columna con resina de níquel, cargándola de igual forma que las otras fracciones, pero utilizando otro *buffer* de elución. Se lavó con 4 volúmenes de columna (1 mL) con *buffer B* pH 6,3 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris/HCl 10 mM, Urea 8 M) y se le dio un *spin* a la columna para secarla. Finalmente se eluyeron 2 fracciones con 250  $\mu$ L de *buffer B* pH 4,5.

#### **2.2.21.4 Purificación de la proteína recombinante mediante el sistema de expresión**

##### ***E. coli* TB1/pMALc2E**

Las células se recolectaron mediante centrifugación a 4.000 x  $\bar{g}$  por 10 min (centrífuga Sorvall® RC-28S y rotor GS-3 Sorvall®, DuPont, CT, USA). El sobrenadante se descartó y el precipitado se suspendió en 15 mL de *buffer* de columna (Tris/HCl 20 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM). Las células se congelaron a -20°C durante la noche (16 h). Al día siguiente se descongelaron en agua fría y se sonicaron con 10 pulsos de 30 s. Se centrifugó a 9.000 x  $\bar{g}$  y 4°C durante 20 min (centrífuga Sorvall® RC-28S y rotor GS-3 Sorvall®, DuPont, CT, USA). El precipitado

correspondió a material insoluble. Del sobrenadante, que correspondió al extracto crudo, se tomó una muestra de 5  $\mu\text{L}$  y se agregó *buffer* SDS-PAGE 5X. Todo esto se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  (muestra 3: extracto crudo). El resto se guardó para ser purificado por cromatografía, pero antes se hizo una prueba de escala piloto. Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de resina de amilasa en un tubo Eppendorf y se centrifugó a  $13.000 \times \bar{g}$  durante 1 min (centrífuga Eppendorf 5403 de Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Luego se descartó el sobrenadante y la resina se resuspendió en 1,5 mL de *buffer* columna. Se centrifugó en las mismas condiciones anteriores 2 veces. Se mezclaron 50  $\mu\text{L}$  de resina con 50  $\mu\text{L}$  de extracto crudo y se incubó en hielo durante 15 min. Se centrifugó a  $13.000 \times \bar{g}$  durante 1 min y el precipitado se lavó con 1 mL de *buffer* columna, el que se volvió a centrifugar en iguales condiciones para finalmente resuspender la resina en 50  $\mu\text{L}$  de *buffer* SDS-PAGE 5X (muestra 4: Proteína de fusión unida a amilosa).

Con el objetivo de purificar la lipasa quimérica, se cargó el resto del volumen del extracto crudo en una columna PD10 (Bio-Rad Laboratories, CA-USA) empacada con 2 mL de resina de amilosa. Para esto se pasaron 2 mL de extracto crudo seguido de 6 volúmenes de columna (12 mL) de *buffer* columna sucesivamente, hasta pasar todo el volumen. Se eluyeron 14 fracciones de 400  $\mu\text{L}$ , cada una con *buffer* columna más maltosa 10 mM. La columna de amilosa se regeneró con la siguiente secuencia de lavados: 6 mL de agua destilada, 6 mL de SDS 0,1% p/v, 2 mL de agua destilada y 6 mL de *buffer* columna. La columna se guardó en etanol 20% v/v.

Posteriormente, para separar la lipasa de la MBP, se utilizó la enzima enteroquinasa. Primero, se hizo una prueba de digestión. Para esto se utilizaron 0,5 ng de

enzima por cada 50 µg de proteína de fusión. La reacción de 60 µL contenía 21 µg de lipasa quimérica, *buffer* de reacción 10X, 1 U de enteroquinasa y el resto de agua destilada, se incubó a temperatura ambiente. Se realizó un control en las mismas condiciones, pero sin enzima. Se tomaron 2 muestras de 15 µL cada una a las 2, 4, 8 y 17 h: una para ver en un gel SDS y otra para realizar un ensayo de actividad.

La digestión final se realizó sobre 280 µg de proteína lipasa quimérica y durante 8 h en iguales condiciones que la prueba de digestión.

Con el fin de purificar la lipasa de la MBP, de la enteroquinasa y de otros contaminantes, se hizo una cromatografía de intercambio iónico. Para esto se dializó la mezcla de clivaje de la proteína de fusión contra 500 mL de una solución Tris/HCl 20 mM, NaCl 25 mM pH 8 en casetes especiales para diálisis de volúmenes pequeños Slide-A-Lyser (Pierce, IL, USA) durante 16 h a 4°C. Al día siguiente, se cambió el *buffer* por solución fresca y se continuó dializando por 4 h más a la misma temperatura.

La cromatografía de intercambio iónico se realizó en un equipo FPLC System (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia), utilizando una columna HR 5/5 de 1 mL (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) empaquetada con resina DEAE sefarosa CL 6B (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) a temperatura ambiente y a un flujo de 0,5 mL/min. Se cargó la muestra y la columna se lavó con *buffer* Tris/HCl 10 mM que contenía NaCl 25 mM (pH 8). El gradiente se realizó en un *buffer* Tris/HCl 20 mM con concentraciones de NaCl desde 25 mM hasta 500 mM al mismo flujo. Se colectaron fracciones de 500 µL.

### **2.2.22 Determinación de la concentración de proteína**

La concentración de proteína para las diferentes muestras se determinó mediante el ensayo de Bradford modificado, para lo cual se mezcló: 2,4 mL de agua destilada, 1 mL de Coomassie 1 g/L preparado en HCl 2,2% v/v y 100  $\mu$ L de muestra o proteína estándar de calibración. Se realizó una curva de calibración con BSA 0,5 mg/mL como solución patrón para la construcción de una curva de calibración en concentraciones entre 0,03 y 0,5 mg/mL. Se midió la absorbancia a 465 (O.D<sub>465</sub>) y 595 nm (O.D<sub>595</sub>) y se calculó la razón O.D<sub>595</sub>/ O.D<sub>465</sub>. El valor obtenido en ausencia de BSA se restó a todas las demás razones y se graficó en función de la concentración de BSA.

La lipasa quimérica se encontraba en una solución mezclada con otras proteínas, por lo que su concentración real no es la que se obtuvo directamente del ensayo Bradford modificado. Sin embargo, para caracterizarla según su actividad específica, era necesario conocer su concentración real. Para esto se utilizó el programa Gel-Pro Analyzer versión 4 (Media Cybernetics, L.P. 1996-2000), que permite obtener una imagen digitalizada de los geles de poliacrilamida o agarosa. De esta forma se digitalizó el gel (Figura 26 B) y se determinó el porcentaje que ocupaba la banda de lipasa quimérica en cada carril, con respecto al total de bandas, y se sacó un promedio. Con este resultado se realizaron los cálculos de actividad específica para la lipasa quimérica.

### **2.2.23 Electroforesis de proteínas**

Las separaciones electroforéticas en condiciones desnaturalantes se realizaron en una cámara vertical MiniProtean II (Bio-Rad Laboratories Inc., CA-USA). Las muestras se prepararon según Bollag y col. (1996). Estas se mezclaron en proporción 4:1 con



*buffer* de carga 5X (Tris/HCl 60 mM, glicerol 25% v/v, SDS 2% p/v, 2- mercaptoetanol 14,4 mM y azul de bromofenol 0,1% p/v pH 6,8), se desnaturalaron por ebullición durante 5 min y posteriormente se cargaron en geles de acrilamida. Las electroforesis se realizaron bajo voltaje constante de 200 V (fuentes de poder Power Pac 1000 de Bio-Rad Laboratories Inc., CA-USA o Power Supply EPS 3500XL de Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia). Como *buffer* de corrida se utilizó Tris-glicina-SDS (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1% p/v) (Bollag y col., 1996).

#### **2.2.24 Medición de actividad lipolítica**

Con el fin de saber si la proteína recombinante tenía actividad, se realizaron dos ensayos diferentes de actividad lipolítica: ensayo de actividad *in situ* y ensayo de actividad líquido. Ambos se repitieron por lo menos dos veces para cada muestra y se detallan a continuación.

##### **2.2.24.1 Ensayo de actividad *in situ***

Para determinar la actividad enzimática *in situ* (en gel), primero se corrió un gel en condiciones desnaturalantes para luego renaturarlo *in situ*. Con este propósito, se utilizó el procedimiento descrito por Hou y col. (1999). El gel se incubó dos veces durante 5 min en isopropanol 25% v/v preparado en *buffer* Tris/HCl 20 mM pH 8 y luego se lavó 2 veces en *buffer* Tris/HCl 20 mM pH 8 durante 8 min cada vez. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente. Luego, se siguió el protocolo descrito por Brahim-Horn y col. (1991) con algunas modificaciones. Se utilizó como sustrato  $\alpha$ -naftilacetato y se solubilizaron 75 mg de éste en una mezcla de 4,7 mL de acetona y 0,3 mL de Triton X-

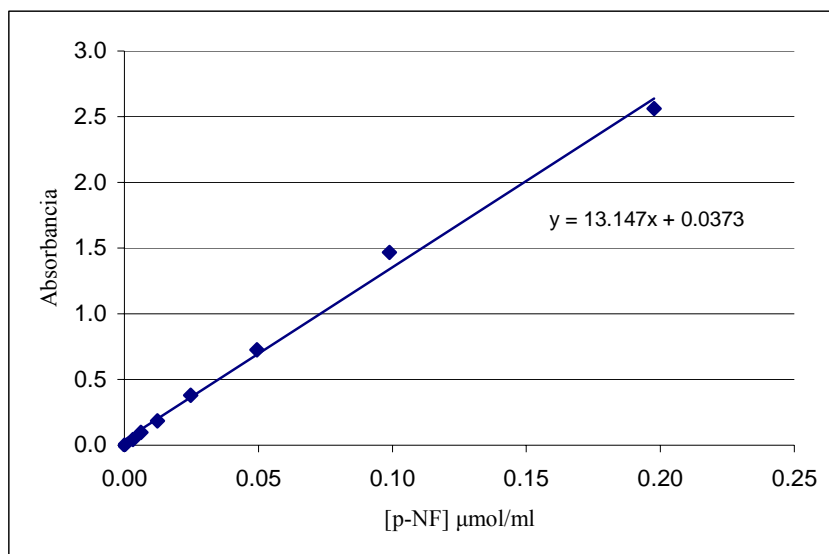
100. La solución obtenida se agregó lentamente a 100 mL de *buffer* Tris/HCl 20 mM pH 8, calentado con anterioridad a 45°C. Posteriormente se agregó 75 mg de Fast Garnet GBC a la solución de sustrato/*buffer* fría. El gel se incubó en la solución de sustrato/Fast Garnet GBC/*buffer* hasta la aparición de una banda café. Todas las soluciones se prepararon en el momento de realizar el ensayo.

#### **2.2.24.2 Ensayo de actividad líquido**

Para la cuantificación de la actividad lipolítica se utilizó el protocolo descrito por Maia y col. (2001) con algunas modificaciones. Para el ensayo estándar se preparó una solución stock de *p*-nitrofenilpalmitato (*p*-NFP) 3 mg/mL en isopropanol como sustrato y una solución amortiguadora de ensayo Tris/HCl 20 mM pH 8, que contiene Triton X-100 4,4 mg/mL y goma arábica 1,1 mg/mL. La solución sustrato/*buffer* se preparó al momento de realizar el ensayo en una proporción 1:35 (solución stock de sustrato: *buffer* de ensayo) para un volumen final de 900 µL para ensayos de rutina y 1,5 mL para ensayos a diferentes temperaturas. El *buffer* de ensayo se calentó a 45°C y se agregó el sustrato lentamente bajo agitación continua. Se dejó enfriar y se utilizó en el ensayo, para lo cual se mezcló esta solución con 100 µL de enzima. La reacción se siguió espectrofotométricamente a 410 nm. Se usó como referencia el *buffer* de ensayo. El blanco se preparó mezclando la solución sustrato/*buffer* con el *buffer* en que se encontrara la proteína en el mismo volumen que la muestra (hidrólisis no enzimática). El ensayo se hizo a varias temperaturas.

### 2.2.24.3 Caracterización de la proteína recombinante

La lipasa se caracterizó según sus propiedades de actividad a baja temperatura. El ensayo de actividad lipolítica líquido se realizó durante 30 min para diferentes temperaturas. Para esto, se utilizó un baño termoregulado (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) para las temperaturas 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, y 40°C. Se graficaron los resultados según la  $O.D_{410}$  en función del tiempo de reacción a las diferentes temperaturas. Con el fin de determinar la actividad se tomó en cuenta la fase estacionaria de la proteína la cual varía según la temperatura del ensayo. Se calculó la velocidad inicial de la reacción como la pendiente de la parte lineal de la curva de progreso. Para esto se calcularon las unidades de absorbancia por minuto para cada temperatura a partir de las pendientes del gráfico anterior producidas cada 5 min de ensayo. El valor se multiplicó por el factor de dilución. Se definió la unidad de actividad lipasa (U) como  $\mu\text{moles } p\text{-nitrofenol/mL}\cdot\text{min}$  formados. Para determinarla se realizó una curva de calibración para diferentes concentraciones de *p*-nitrofenol (*p*-NF) a pH 8 y se midió la absorbancia a 410 nm (Figura 7).



**Figura 7.** Curva de calibración de *p*-nitrofenol.

Se muestra la ecuación de la recta cuya pendiente es 13,14 unidades de absorbancia\*mL/μmol.

Se observó una pendiente de 13,14 unidades de absorbancia \*mL/μmol, por la cual se dividió las unidades de absorbancia por minuto calculadas, obteniéndose así los μmoles *p*-NF/mL\*min formados (U). Finalmente los datos se graficaron como la actividad de la proteína en función del tiempo para cada temperatura. Del gráfico se determinó la actividad de la lipasa en su estado estacionario para cada temperatura.

Se sabe que la ecuación de Arrhenius es  $k_{cat} = Ae^{-E_a/RT}$ , donde  $k_{cat}$  es la constante cinética de velocidad, A es una constante para la reacción,  $E_a$  es la energía de activación de Arrhenius, T es la temperatura del sistema en °K y R es la constante universal de los gases. Al aplicar logaritmo se obtiene  $\log k_{cat} = -E_a/RT + \log A$ . Por lo tanto, al hacer un gráfico del  $\log k_{cat}$  en función del inverso de la temperatura en °K, se obtiene una recta cuya pendiente es igual a  $-E_a/R$ . Sabiendo que  $R = 1,98 \times 10^{-3}$  kcal/mol\*°K se

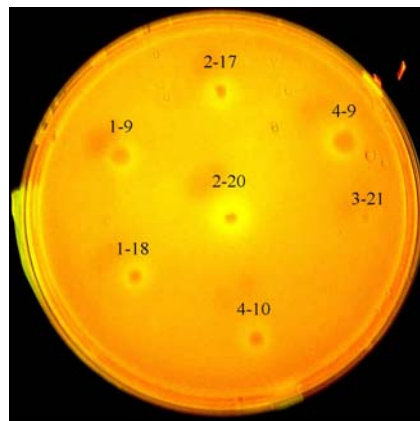
obtiene el valor de la  $E_a$  para la enzima. Para determinar la  $k_{cat}$  de la reacción se utiliza la ecuación  $V_{max} = k_{cat}[E_T]$ , en que  $V_{max}$  revela el número de recambio de una enzima, que es análogo a las unidades (U) de la enzima, y  $[E_T]$  es la concentración de la enzima en la reacción. La concentración real de la proteína en la solución se determinó utilizando el programa Gel-Pro Analyzer. Para determinar la concentración en  $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ , se utilizó un programa de conversión de peso a moles para un cierto tamaño de proteína en kDa: "Practical Molecular Biology" (<http://molbiol.ru/eng>). Finalmente se determinó  $k_{cat}$  como el cociente entre U y los  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  de enzima en el ensayo para cada reacción a diferentes temperaturas, lo que representa la actividad específica de la proteína. Se hizo un gráfico de Arrhenius con los resultados, considerando la  $k_{cat}$  de la lipasa a los 5, 10 y 15°C debido a que a temperaturas más altas se sobrepasa la  $E_a$ . A partir de la pendiente se obtuvo el valor de  $-E_a/R$  el que se multiplicó por la constante de los gases ( $R = 1,98 \times 10^{-3} \text{ kcal/mol} \cdot ^\circ\text{K}$ ) y se determinó la energía de activación en kcal/mol.

### 3. RESULTADOS

---

#### 3.1 Selección de cepas productoras de lipasa

Con el objetivo de identificar las cepas bacterianas de origen marino antártico que secretan lipasas con alta actividad a bajas temperaturas, se crecieron 7 aislados bacterianos diferentes en medio marino-agar suplementado con rodamina B y aceite de oliva como sustrato. Luego de 72 h de incubación a 4°C, las placas se expusieron a luz UV (350 nm) y fueron fotografiadas (Figura 8).



**Figura 8.** Identificación de cepas productoras de lipasa en placas de agar-rodamina B.

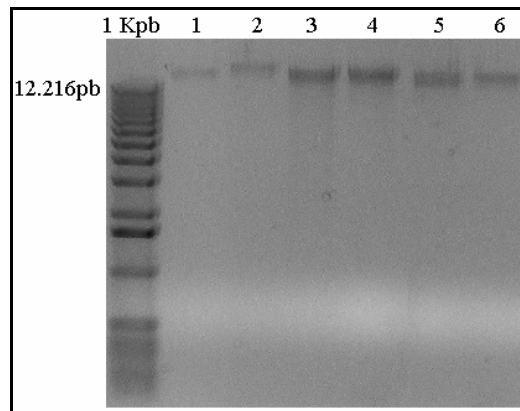
Las cepas productoras de lipasa se distinguieron visualmente mediante su crecimiento en placas de agar suplementadas con sustrato específico para el ensayo. Los números sobre cada colonia indican la cepa bacteriana.

Las cepas productoras de lipasa se distinguieron claramente de forma visual por la formación de un halo naranja fluorescente alrededor de la colonia. De las 7 cepas, 6 secretaron lipasas activas a baja temperatura de las cuales las cepas 2-17 y 2-20 se

caracterizaron por tener una razón de tamaño halo/tamaño colonia significativa indicando una mayor cantidad de enzima producida y/o mayor actividad.

### 3.2 Extracción de DNA genómico de las cepas seleccionadas

Se extrajo el DNA genómico de las 6 cepas bacterianas seleccionadas por ser productoras de lipasa, con el fin de utilizarlo como templado para la amplificación de fragmentos de genes codificantes para esta enzima (Figura 9).



**Figura 9.** Análisis electroforético del DNA genómico de cepas productoras de lipasa.

Se cargó aproximadamente 150 ng de cada DNA genómico, en un gel de agarosa al 0,8% p/v. Cepas (1) 1-9, (2) 1-18, (3) 2-17, (4) 2-20, (5) 4-9, (6) 4-10.

Se observa la integridad del DNA genómico y la ausencia de contaminantes. El grado de pureza y la concentración del DNA genómico de las diferentes cepas se midieron según lo indicado en la sección 2.2.4 de materiales y métodos. En todos los casos el DNA genómico se obtuvo de forma pura, como lo demuestra el coeficiente  $O.D_{260}/O.D_{280}$  de cada uno de los DNA que fue siempre entre 1,8 y 2,0.

### **3.3 Diseño de partidores para la amplificación de un fragmento de gen codificante para lipasa**

Para la construcción de partidores específicos para la amplificación de genes para lipasas se trabajó con la información disponible en las bases de datos de secuencias previamente publicadas. Primero se trabajó utilizando la información provista por Lipase Engineering Database LED (<http://www.led.uni-stuttgart.de>), que proporcionó alineamientos múltiples para familias de lipasas (Pleiss y col., 2000; Fischer y Pleiss, 2003). Se seleccionó la clase de lipasas del tipo GGGX, que lleva este nombre debido a la secuencia consenso, y de la superfamilia de las HSL, debido a que las lipasas adaptadas a bajas temperaturas se encuentran en este grupo (Jaeger y col., 1994). Como base de datos de secuencias de lipasas se seleccionó cómo familia homóloga a la de *Moraxella s.p* que produce la lipasa 2 debido a los antecedentes en la literatura (Feller y col., 1991). El alineamiento de las secuencias de lipasas psicrófilas mostró 3 regiones conservadas: la primera, HGGG, se describe en la literatura como una secuencia altamente conservada entre las lipasas del grupo IV, en que la tercera glicina formaría parte de la cavidad oxianiónica; la segunda, GDSAG, también descrita como un pentapéptido altamente conservado en lipasas adaptadas a bajas temperaturas, contiene el aminoácido serina que formaría parte del sitio activo y una alanina de la cavidad oxianiónica. La tercera secuencia conservada encontrada contiene el aspartato de la triada catalítica. Posteriormente se seleccionaron 6 secuencias aminoacídicas a partir de organismos procariontes y con antecedentes de producir lipasas o esterases con actividad a bajas temperaturas, y se hizo un alineamiento múltiple de la secuencia de estas



proteínas mediante el programa Omiga 2.0 (Rainbow Sentinel/LM, Rainbow Technologies, inc.). Los números de acceso en la base de datos *GeneBank* de estas secuencias nucleotídicas son: AY496581 (Lee y col., 2004), AB029896 (Mizuguchi y col., 1999), AF514856 (Jung, sin publicar), AF034088 (Choo y col., 1998), X53868 (Feller y col., 1991), AB112812 (Kulakova y col., 2004) y AF514856 (Kim, sin publicar). Se detectaron 3 regiones altamente conservadas (Figura 10).

Código de Acceso	Secuencia de aminoácidos	Región Conservada
AAC38151	61 LDARLYRPLEE-----DNLPLLVFFHGGGFVFMGNLDTHDNLC 97	F F H G G G Y Y H G G G
AAQ08176	60 LTLRVYEFEGT-----GFFPALVYYHGGGWVLSLDTHDSIC 96	Y F H G G G
AAS77247	63 IPIRIYTPAGS-----GPFGALVYFHGGGWVIGNIETHDVTG 99	F F H G G G
RAA82510	64 LPIRIYTPVAAP-----PGPLPVLVFFHGGGFVIGSLDSDHAPC 102	Y F H G G G
BAD06009	109 MTIRCYQSDASSHGLGFKKADTHNSDETVLVLYFHGGGFICIGDVNTHHEFC 158	F F H G G G
P24484	139 MTRVRCYQKSTQ-----NSERKSTDEAAALFHHGGFCIGDIDTHHEFC 181	x f h G G G
	: * * : : : : * * * * : * : : : * . *	
AAC38151	148 RLALAGDSAGGNLALAVSRLAAQRQG----- 173	G D S A G G G D S A G G
AAQ08176	147 KIAVGGDSAGGNLAAVVSILAKORQG----- 172	G D S A G G
AAS77247	150 RIAVGGDSAGGNLAAAIALMARDRG----- 175	G D S A G G
RAA82510	153 RIAVGGDSAGGNLSAVVSQQLRDAG----- 178	G D S A G G
BAD06009	209 RIVLAGDSAGGGLSTLIAAQLSAPSQVAWSDLG---SAGQKMFLLER--- 253	G D S A G G
P24484	233 RIVLSGDSAGGCLAALVAQVVIKPIDALWQDNNQAPAADKKVNDTFKNSL 281	G D S A G G
	: : : : * * * * * * * : * : : :	
AAC38151	220 TG--QGDDPLASPLRAETLADLPPTTLITAEFDPLRDEGEAFALRLQQAG 267	A E F D P L R A Q Y D P L R
AAQ08176	220 KE--EEQHPYNAFVLEDLSSLPSTIITIAQYDPLRDSGKDYADALKNHG 267	A E F D P L R
AAS77247	223 KD--RAN--PYACPSRAKSLAGLPPAFVITAEFDPLRDEGEAYGQELRKAG 269	A G F D P L R
RAA82510	225 GGGVDLADPRFSPRLRHANLGNLGTIHVVVAGFDPLRDEGIAYAEALKAAG 274	A E L D V L R
BAD06009	301 SP--LPRQHILNCPMLGDNKVCPTYIVAAELDLRDEAFAYAKQLKWHG 348	A E L D I L R
P24484	331 SG--LPQSHPLISVMHGDNTQLCPSYIVVAELDLRDEGLAYAEELQKEG 378	A e x D p L R
	: : : : * * * * * : : : * *	

**Figura 10.** Alineamiento de lipasas psicrófilas.

Las regiones subrayadas en rojo son las secuencias de aminoácidos que determinan las regiones altamente conservadas que se muestran en un bloque. Se indican el primer y último nucleótido. Se muestra el código de acceso de cada proteína obtenidas a partir de la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov>).

Luego, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas que codifican para estas proteínas. Se determinaron los nucleótidos conservados a partir de

las regiones aminoacídicas conservadas. A partir de las regiones conservadas se diseñaron 8 partidores, 4 degenerados y 4 específicos. Para los específicos se conservó el nucleótido que más se repetía en cada posición. Para los degenerados, cuando no existía 100% de coincidencia en todas las posiciones, se puso la letra que representaba a los posibles nucleótidos. A partir de la primera región altamente conservada xFHGGG se diseñaron los partidores con sentido LF1 y LDF1. La segunda región altamente conservada GDSAGG se tomó como base para diseñar los partidores sentido LF2 y LDF2 y los antisentido LR1 y LDR1. Por último, a partir de la tercera región conservada AexDpLR se diseñaron los partidores antisentido LR2 y LDR2. Los oligonucleótidos fueron diseñados con Tm entre los 57 y 60°C y de largos variables entre 17 y 23 pb. Las secuencias de estos partidores con su respectiva Tm se indican en la Tablas 5.

**Tabla 5.** Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de fragmentos de genes codificantes para lipasas activas a bajas temperaturas.

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia (5'→3')</b>	<b>Tm (°C)</b>
LF1	TGTTTTTTCATGGCGGCGG	58
LF2	GGCGATAGTGCCGGCGG	60
LR1	CCGCCGGCACTATCGCC	60
LR2	GCAACGGGTCAAATTCGGC	60
LDF1	TGKTRTWTTTYCATGGSGGYGG	60,2
LDF2	GGMGAYAGYGCYGGSGG	57,9
LDR1	CCSCCRGCRCTRCKCC	57,9
LDR2	TCWCGYAABRGRTCWAAAYTCBGC	57,2

M: A/C, R: A/G, W: A/T, S: C/G, Y: C/T, K: G/T y B: C/G/T.

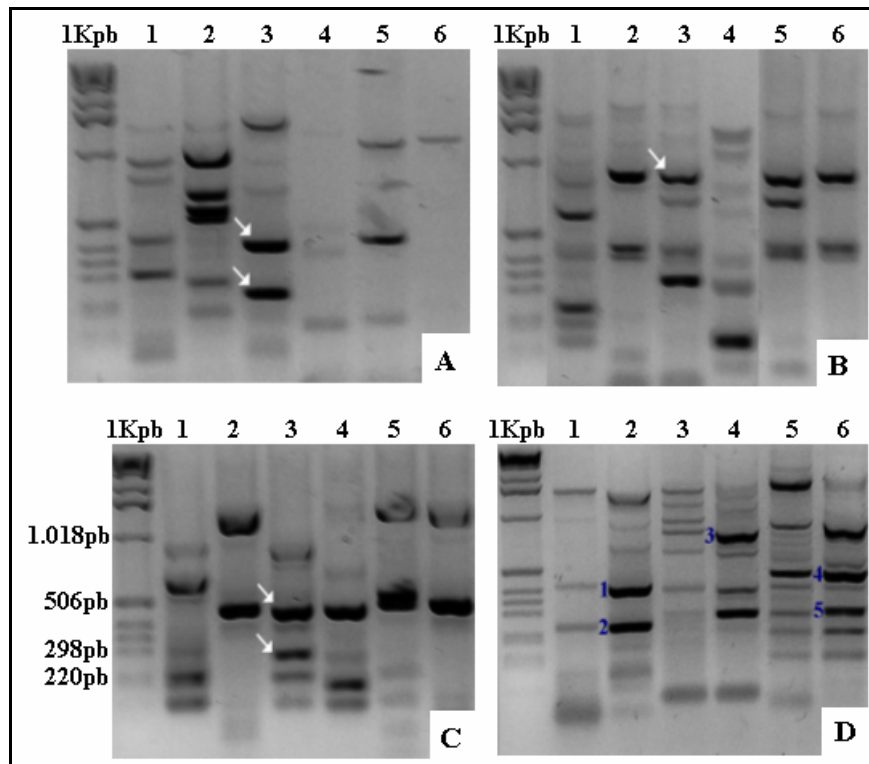
Los tamaños esperados de los fragmentos amplificados con los partidores diseñados, se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Tamaños esperados de amplificados.

<b>Pareja de partidores</b>	<b>Tamaño fragmento esperado (pb)</b>
LF1-LR1 y LDF1-LDR1	240
LF1-LR2 y LDF1-LDR2	530-600
LF2-LR2 y LDF2-LDR2	300-370

### **3.4 Amplificación de DNA genómico utilizado partidores diseñados para lipasa**

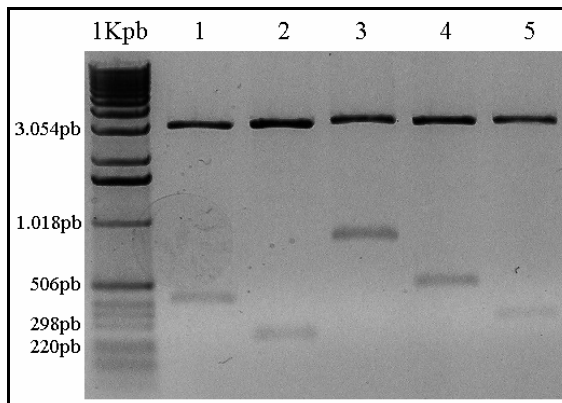
Se mezclaron los 6 DNA con el fin de utilizarlos como templado para probar los partidores diseñados. Se utilizaron las 12 parejas posibles y se obtuvieron productos de amplificación definidas de los tamaños esperados al utilizar las parejas LF1-LR1, LF1-LR2 y LF2-LR2. Se siguió trabajando con estos partidores y con los DNA por separado. Se amplificó por PCR los 6 materiales genéticos utilizando las 3 parejas de partidores para cada uno. Se obtuvieron bandas definidas del tamaño esperado al utilizar como templado el DNA de la cepa 2-17 (Figura 11A, 11B y 11C), por lo que se siguió trabajando con ésta. Se hicieron dos tipos de PCR utilizando este DNA como templado: uno específico de 35 ciclos y otro degenerado con 5 ciclos previos de diferentes características a los siguientes 35 ciclos principales, con una menor temperatura de alineamiento. Este último resultó amplificar bandas más definidas del tamaño esperado, las que se cortaron del gel y se purificaron para su posterior secuenciación (Figura 11D).



**Figura 11. Electroforesis de los productos de amplificación**

Para las fotos A, B y C; (1) cepa 1-9, (2) cepa 1-18, (3) cepa 2-17, (4) cepa 2-20, (5) cepa 4-9, (6) cepa 4-10. (A) Amplificados con partidores LF1-LR1. (B) Amplificados con partidores LF1-LR2. (C) Amplificados con partidores LF2-LR2. Las flechas blancas indican las bandas de tamaños esperados. (D) Amplificados de la cepa 2-17. (carriles 1, 3 y 5) PCR específico, (carriles 2, 4 y 6) PCR inespecífico, (carriles 1 y 2) amplificados con partidores LF1-LR1, (carriles 3 y 4) amplificados con partidores LF1-LR2, (carriles 5 y 6) amplificados con partidores LF2-LR2. Los números en azul indican los productos de amplificación que fueron cortadas y purificadas.

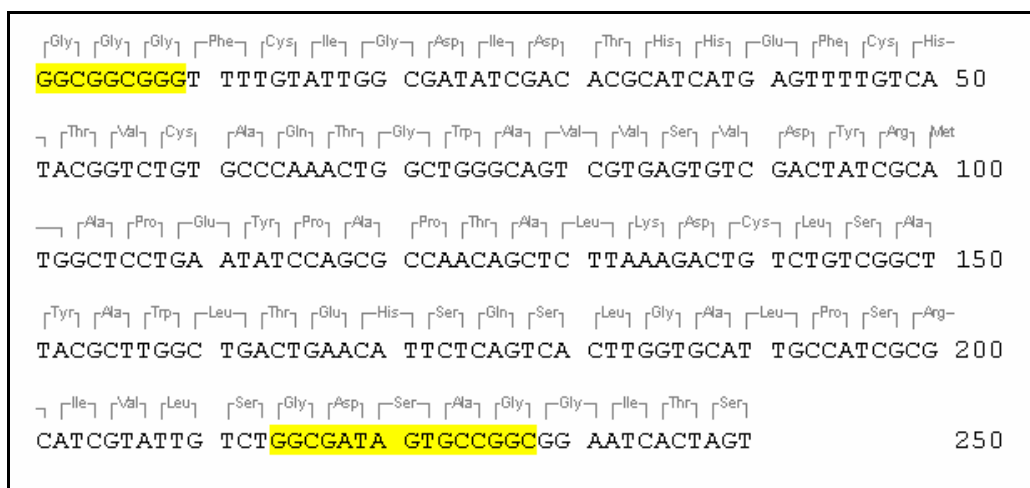
Los productos de amplificación se purificaron y se ligaron al vector de clonamiento pGEM-T Easy y se clonaron en la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*, con lo que se consiguió un alto número de copias del vector con el inserto corroborado por un PCR de colonias. La presencia del inserto de tamaño esperado se visualizó mediante una digestión con *EcoRI* del vector obtenido a partir de la minipreparación (Figura 12).



**Figura 12.** Electroforesis de los productos de digestión de vectores con *EcoRI*.

(1) Banda 1, (2) Banda 2, (3) Banda 3, (4) Banda 4, (5) Banda 5. Se observan los tamaños esperados para cada banda y vector pGEM-T Easy linearizado de 3.015 pb.

Los 5 productos de amplificación se mandaron a secuenciar. Sin embargo, sólo la banda 2 resultó ser un fragmento de gen parcialmente codificante para lipasa. Este fragmento tenía un tamaño de 240 pb que codificaban para 80 aminoácidos (Figura 13).



**Figura 13.** Análisis de la secuencia del fragmento de gen codificante para lipasa.

Se muestra la secuencia del fragmento de gen de 240 pb que codifican parcialmente para una lipasa, cuya secuencia aminoacídica se indica sobre ésta. Las secuencias nucleotídicas destacadas en amarillo codifican para los péptidos altamente conservados de lipasas del grupo IV o HSL.

En el péptido codificado se pudo identificar 2 regiones altamente conservadas características de lipasas bacterianas del grupo IV o HSL. La secuencia se analizó mediante Blastx, (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>) (Tabla 7).

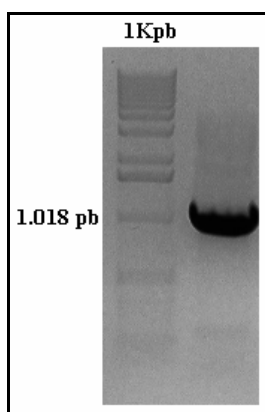
**Tabla 7.** Resultado de Blastx a la secuencia de 240 pb.

<b>Proteína</b>	<b>Organismo</b>	<b>% Identidad</b>	<b>Valor E</b>
Lipasa 2	<i>Moraxella sp.</i>	96	$3e^{-39}$
Lipasa	<i>Psychrobacter sp.</i> St 1	79	$8e^{-34}$
Similar a esterasa/lipasa	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i> K5	75	$6e^{-33}$
Enzima lipolítica	<i>Burkholderia cepacia</i> R18194	55	$7e^{-21}$

Existe una alta identidad a nivel de secuencia aminoacídica con la lipasa 2 de *Moraxella sp.* y con enzimas lipolíticas de organismos del género *Psychrobacter*.

### 3.5 Análisis 16S de la cepa 2-17

Se amplificó un fragmento del DNAr 16S utilizando como templado DNA genómico de la cepa 2-17 y partidores especialmente diseñados para eso (Figura 14).

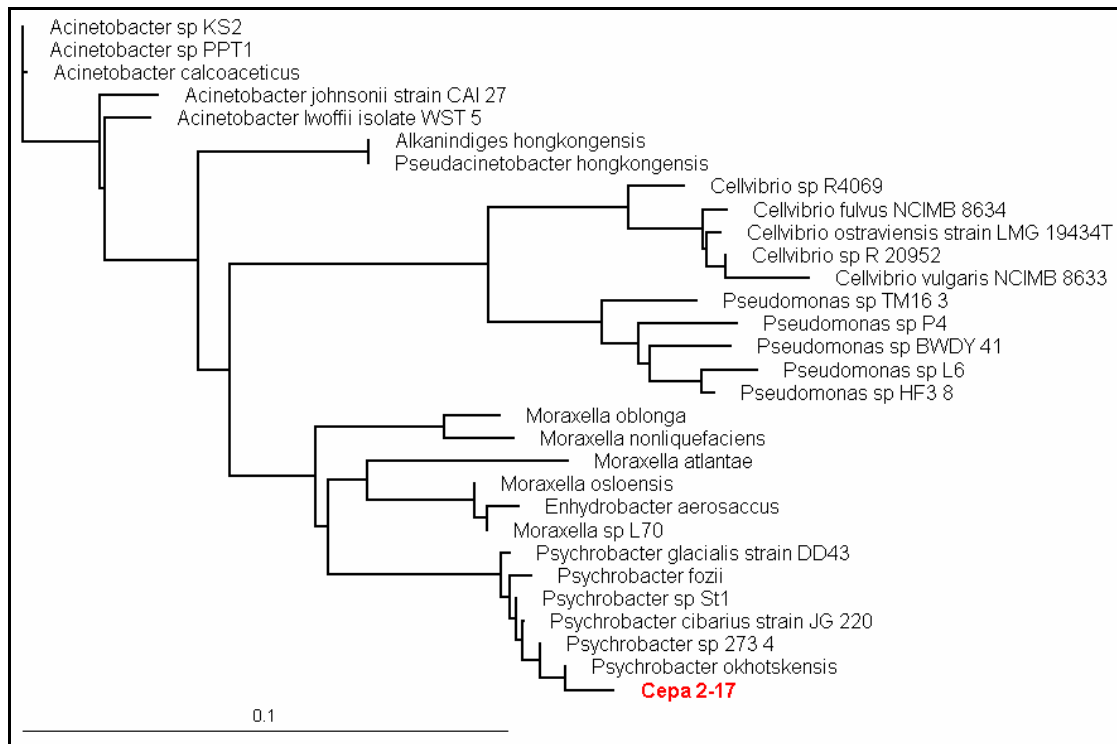


**Figura 14.** Análisis electroforético del producto de amplificación del DNA 16S.

Se distingue un producto de amplificación cercano a los 1.000 pb correspondiente al DNA 16S.

La secuencia genética casi completa del DNAr 16S de la cepa 2-17, que consistía en 1.064 nucleótidos (material complementario 7.3), se analizó mediante el algoritmo Blastn, utilizando la base de datos de GenBank, nr. La secuencia de DNA mostró tener un 99% de identidad con 33 especies diferentes de *Psychrobacter*, entre ellas *Psychrobacter okhotskensis*, *Psychrobacter fozii*, *Psychrobacter urativorans* y *Psychrobacter luti*. El resto de secuencias arrojadas por el programa tenían una identidad del 98%.

Se realizó un análisis filogenético con secuencias de DNAr 16S de bacterias pertenecientes a las familias *Moraxellaceae* (a la cual pertenece el género *Psychrobacter*) y *Pseudomonadaceae*, ambas del orden *Pseudomonadale*. El árbol filogenético construido con los resultados obtenidos de las bases de datos, corroboran que el aislado bacteriano 2-17 es un miembro del género *Psychrobacter* y que está íntimamente relacionado con *Psychrobacter okhotskensis* (Figura 15).



**Figura 15.** Árbol filogenético basado en la secuencia del gen de RNA ribosomal 16S.

Se construyó un árbol filogenético basado en las secuencias de DNAr 16S de las familias *Moraxellaceae* y *Pseudomonadaceae* pertenecientes al orden *Pseudomonadales*. El árbol se construyó utilizando los programas BioEdit (Hall, 1999) y TreeView (Page, 1996). La ubicación de la cepa 2-17 se destaca en negrita.

En el árbol filogenético se observa que el DNAr 16S de la cepa 2-17 se posiciona junto a la familia *Moraxellaceae*, muy cercano al género *Psychrobacter*, por lo que cabe esperar que ésta cepa bacteriana pertenezca a ese género.

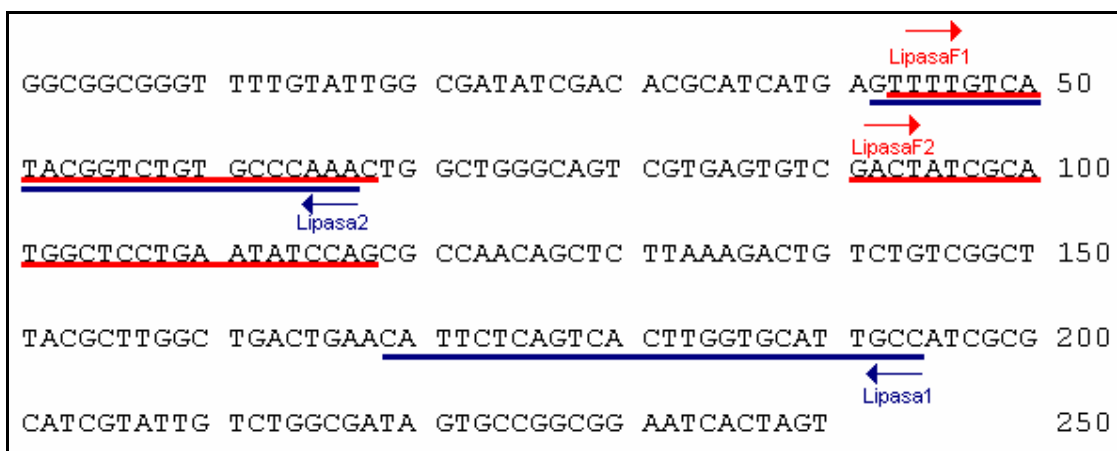
### 3.6 Búsqueda de las secuencias río arriba y río abajo del gen codificante para lipasa

Una vez obtenida la secuencia del fragmento de gen codificante para lipasa se diseñaron partidores específicos con el fin de obtener la secuencia completa del gen mediante una técnica de *genome walking*.



### 3.6.1 Diseño de partidores para la obtención de las secuencias río arriba y río abajo

A partir de la secuencia parcial del gen codificante para lipasa encontrado se diseñaron partidores específicos para obtener las secuencias río arriba y río abajo del fragmento del gen y por ende, la secuencia completa. En la Figura 16 se esquematiza el diseño de los partidores. Sus secuencias y Tm se detallan en la Tabla 2.

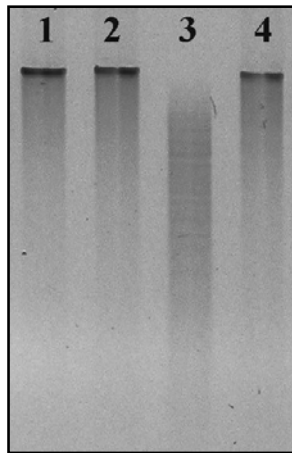


**Figura 16.** Partidores para la amplificación de secuencias río arriba y río abajo del gen de lipasa.

Las secuencias subrayadas en rojo indican los partidores LipasaF1 y LipasaF2. Las secuencias subrayadas en azul indican los partidores Lipasa1 y Lipasa2.

### 3.6.2 Digestión DNA genómico de la cepa 2-17

Se probó con 4 enzimas de restricción para digerir totalmente el DNA genómico de la cepa 2-17, que corresponde a la cepa aislada a partir de la cual se extrajo el fragmento de gen codificante para lipasa (Figura 17).

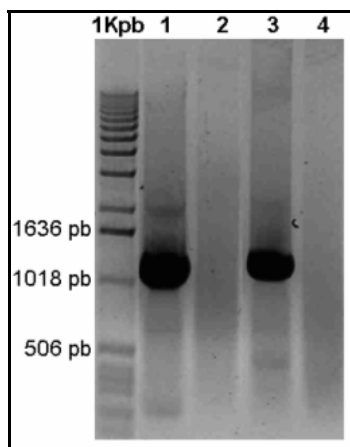


**Figura 17. Digestión DNA genómico de la cepa 2-17.**

Se probaron las enzimas de restricción *Bam*HI (1), *Eco*RI (2), *Hind*III (3), *Xba*I (4). La mejor digestión se obtuvo con la enzima *Hind*III.

Debido a que fue la mejor enzima en digerir, se seleccionó la digestión con *Hind*III y se purificó como se describe en materiales y métodos. Se realizó una extensión de los extremos recesivos por separado utilizando *Taq* DNA polimerasa y dNTPs, con el fin de rellenar los extremos cohesivos con adenina en el extremo 3'. Se ligó al adaptador *AdaptHindIII*total y se elongó con el partidor *Lipasa1* para el extremo 5' y con el partidor *LipasaF1* para el extremo 3'. Estos productos se utilizaron como templados para el PCR con los partidores *AdaptF2* y *Lipasa2* o *LipasaF2* para la obtención de los

extremos 5' y 3', respectivamente. Además, se hizo un control negativo para ambas amplificaciones sin el partidor Lipasa2 o LipasaF2 (Figura 18).



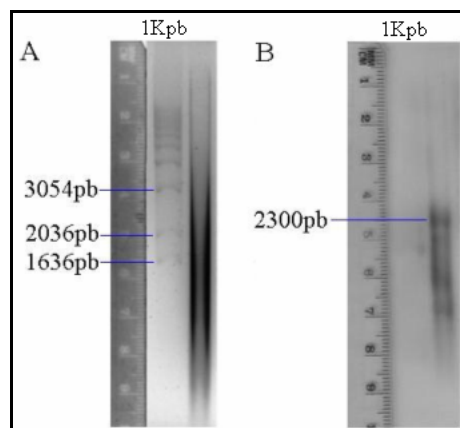
**Figura 18.** Análisis electroforético de los productos de PCR para la obtención de los extremos 3' y 5' del fragmento de gen codificante para lipasa.

(1) Amplificado con partidores LipasaF1 y LipasaF2. (2) Control negativo, PCR sin el partidor Lipasa F2. (3) Amplificado con partidores Lipasa1 y Lipasa2. (4) Control negativo, PCR sin el partidor Lipasa2.

Estos fragmentos amplificados se cortaron del gel y se purificaron. Se ligaron al vector de clonamiento pGEM-T Easy y se clonaron en la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*, con lo que se obtuvo un alto número de copias del vector con el inserto. Se corroboró la presencia de inserto mediante una digestión con *EcoRI* del vector obtenido a partir de la minipreparación y el DNA se mandó a secuenciar. Ambas secuencias se analizaron mediante Blast (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) utilizando la base de datos de GenBank, nr. Correspondieron a fragmentos de genes codificantes para lipasas. Junto al primer fragmento encontrado de 240 pb, se reconstruyó la secuencia completa del gen.

### 3.6.3 Validación del método mediante Southern Blot

El método de *genome walking* que se utilizó para encontrar la secuencia de los extremos 3' y 5' del gen codificante para lipasa, se estandarizó en el laboratorio (CIBYB, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile) y se validó mediante hibridación Southern. Al utilizar como sonda el fragmento de gen de lipasa de 240 pb obtenido en un principio para hibridar el DNA genómico de la cepa 2-17 digerido con *HindIII*, se observó una banda de 2.300 pb correspondiente al tamaño comprendido entre los cortes de *HindIII* que contiene al gen codificante para lipasa (Figura 19).



**Figura 19.** Hibridación Southern del gen de lipasa sobre DNA genómico de la cepa 2-17 (A) DNA cepa 2-17 digerido con *HindIII*, la fotografía fue tomada luego de correr el gel previo a la transferencia. (B) Revelado de la hibridación Southern con sonda específica para la lipasa de la cepa 2-17, se distingue una banda del tamaño esperado de 2.300 pb.

Bajo la banda de 2.300 pb se observaron bandas no definidas, esto se puede deber a digestiones inespecíficas del DNA genómico de la cepa 2-17, que contienen la secuencia utilizada como sonda. Lo importante es que no se detectaron bandas de mayor tamaño debido a que eso estaría indicando una inespecificidad de la sonda.

### 3.7 Análisis de la secuencia de lipasa obtenida

Las secuencias obtenidas por el método de *genome walking* fueron analizadas con el programa Omega y se pudo reconstruir una secuencia de DNA de 2.300 pb. En este constructo se encontró un ORF de 1.293 pb, que codifica para un péptido de 431 aminoácidos (Figura 20).

MPILPVPSLN	ALLTKTLKTV	KKTAAKNVHQ	HHILHHTLKG	LDNLPTPLLE	50
RVNHQLKAST	AEQYPLADAH	LRLILAVSNK	LKRPLALDKL	PNLRQKEGTD	100
AVSLQAPSVW	QQNAEASGNS	ENAVSWQDKT	IANADGGDMT	VRCYQQSKQN	150
NEGKSTDEVA	MLFFHGGGFC	IGDIDTHHEF	CHTVCAQTGW	AVVSVDYRMA	200
PEYPAPTALK	DCLSAYAWLT	EHSQSLGALP	SRIVLSGDSA	GGCLAALVAQ	250
QVIKPIDALW	QDNNQATETD	KKANDTEFKS	LADLPRPLAQ	LPLYPVTDYE	300
AEYPSWELYG	EGLLLDHNDA	NVENTAYTQH	SGLMQSHPLI	SVMHGDNAHL	350
CPSYVVVAEL	DILRDEGLAY	AELLQKEGVK	VETYTVLGAP	HGFINLMSVH	400
QGLGNQTNYI	IKSFACFVQN	LLTSEGDEPN	L		450

**Figura 20.** Secuencia aminoacídica de la lipasa.

Secuencia aminoacídica de la lipasa producida por la cepa 2-17. Los péptidos subrayados con rojo indican las secuencias altamente conservadas en lipasas bacterianas del grupo IV. Las que se subrayan en azul son los aminoácidos HG característicos de lipasas en que la histidina formaría parte de los aminoácidos de la triada catalítica junto con la serina y el aspartato destacados en amarillo.

Esta secuencia se analizó mediante la herramienta Blastp (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>), utilizando la base de datos de GenBank, nr, arrojando los resultados mostrados en la Tabla 8.

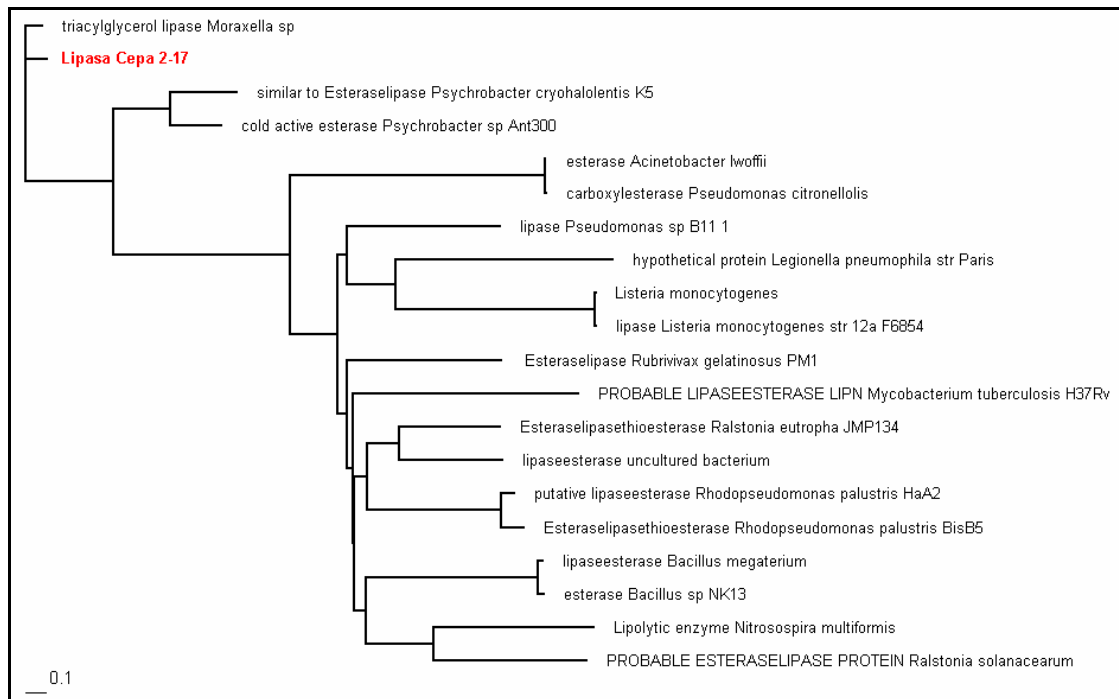
**Tabla 8.** Resultado de Blastp a la secuencia de la lipasa aislada.

<b>Proteína</b>	<b>Organismo</b>	<b>% identidad</b>	<b>Valor E</b>
Lipasa 2	<i>Moraxella sp</i>	89	0,0
Similar a esterasa/lipasa	<i>Psychrobacter cryohalolentis K5</i>	55	$3e^{-128}$
Lipasa	<i>Psychrobacter sp. St1</i>	51	$3e^{-113}$

Se muestran los 3 primeros resultados arrojados por el programa Blastp. Todos los valores E son bajos, indicando una muy baja probabilidad de alineamientos al azar. Asimismo, se observa una muy alta identidad a nivel de secuencia aminoacídica con la proteína lipasa 2 de *Moraxella sp* (Material complementario 7.4).

### **3.8 Análisis filogenético de la secuencia de lipasa**

Con el fin de visualizar la distancia evolutiva de la nueva lipasa con respecto a las lipasas descritas en la literatura, se realizó un análisis filogenético. Para la construcción del árbol filogenético de las proteínas lipasas se alinearon las 20 primeras secuencias aminoacídicas de lipasas de origen bacteriano obtenidas de un análisis Blast Psi de la secuencia de lipasa obtenida a partir de la cepa 2-17. La base de datos utilizada fue la de GenBank, nr (<http://www.ncbi.nih.gov>). Luego del alineamiento mediante ClustalW, utilizando el programa BioEdit, se aplicó la herramienta “ProtDist→ Neighbor phylogenetic tree”. El árbol resultante se muestra en la Figura 21.



**Figura 21.** Árbol filogenético basado en la secuencia de la lipasa aislada.

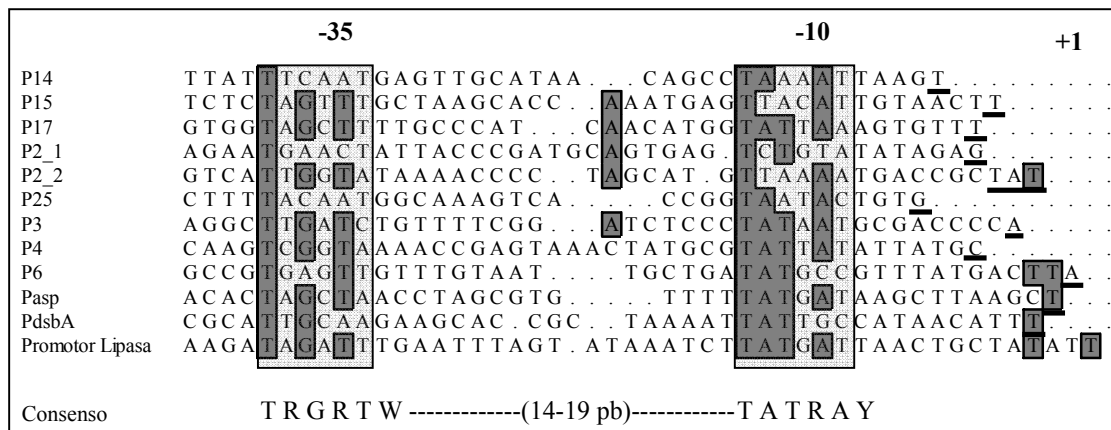
Se construyó un árbol filogenético basado en las secuencias de lipasa. La lipasa producida por la cepa 2-17 se destaca en rojo. Se observa que se posiciona junto a la lipasa 2 de *Moraxella sp.* La barra indica el número de sustituciones aminoacídicas por sitio. El árbol se construyó utilizando los programas BioEdit (Hall, 1999) y TreeView (Page, 1996).

Se observa una cercanía filogenética de la lipasa aislada a partir de la cepa 2-17 con la lipasa 2 de *Moraxella sp.*

### 3.9 Análisis de la secuencia río arriba del gen codificante para lipasa

Como se obtuvo la secuencia río arriba del gen codificante para lipasa mediante el método de *genome walking*, se realizó un análisis de ésta. La región de DNA podría incluir un promotor (región -10 y -35) para el gen de lipasa y el sitio de inicio de la transcripción. Con el propósito de encontrar un posible promotor se utilizó como referencia el trabajo de Duilio y col. (2004) en el cual se analizan promotores de la

bacteria psicrófila *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 (*phTAC125*). Esta es una bacteria Gram negativa al igual que *Psychrobacter* y pertenecen a la misma clase. Se realizó un alineamiento entre las regiones promotoras reportadas en el trabajo y la secuencia río arriba del codón de inicio ATG del gen codificante para lipasa (Figura 22).



**Figura 22.** Alineamiento de regiones promotoras de *phTAC125* y del gen codificante para lipasa.

El sitio de inicio de la transcripción (+1) determinado está subrayado para las regiones promotoras reportadas. Los puntos indican *gaps* introducidos para maximizar el alineamiento. Las regiones -35 y -10 están encerradas en un recuadro. Los nucleótidos con sombreado en gris oscuro poseen más de un 65% de identidad. La región consenso está indicada. R: A o G; Y: T o C; W: A o T.

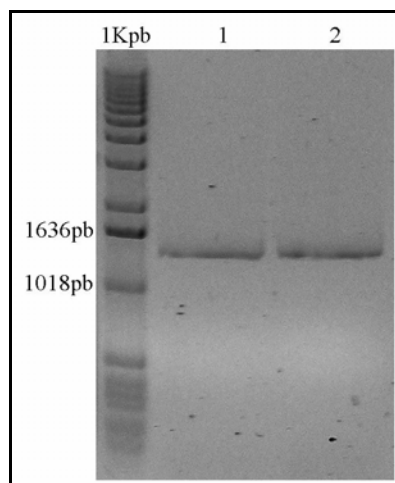
La potencial región promotora se encontraría 62 pb río arriba del codón de inicio ATG del gen codificante para lipasa, y el espaciador sería de 18 pb.

### 3.10 Expresión recombinante del gen de lipasa aislado en *E. coli*

Para expresar el gen aislado en *E. coli* se utilizaron dos vectores de expresión diferentes: pET-22b(+) y pMAL-c2E. Con el propósito de obtener el gen codificante para lipasa con los sitios de restricción apropiados para ser clonados en cada vector, se amplificó por PCR el ORF completo del gen directamente del DNA genómico de la cepa



2-17 con partidores que insertaron los sitios de restricción necesarios (Tabla 3). Se utilizó la Elongasa® debido a que comete menos errores que la *Taq* DNA polimerasa, condición necesaria para la posterior expresión correcta de los fragmentos amplificados. Se utilizó el programa de PCR descrito en la sección 2.2.6.2. (Figura 23).



**Figura 23.** Productos amplificados del gen aislado para insertar sitios de restricción.

(1) Amplificado con pMALLipF y pMALLipR (2) amplificado con pET22LipF y pET22LipR.

Los productos de PCR resultantes se cortaron desde el gel, se purificaron y se ligaron en pGEM-T Easy para posteriormente ser clonados en la cepa DH5a de *E. coli* con el fin de obtener un alto número de copias. De minipreparaciones de DNA plasmidial se obtuvieron los vectores pGEMAL (pGEM-T Easy más el inserto con sitios de restricción *KpnI* y *HindIII*) y pGET22 (pGEM-T Easy más el inserto con sitios de restricción *NcoI* y *XhoI*) (Tabla 9). Para ligar el gen en pMAL-c2E, se digirió el vector pGEMAL con las enzimas *KpnI* y *HindIII*. Asimismo, para ligar el gen en pET22 se digirió el vector pGET22 con las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI*. Las digestiones se

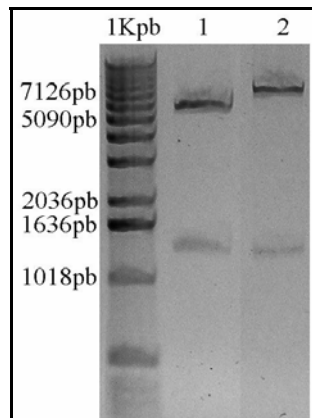
analizaron en un gel de agarosa, se cortó el fragmento correspondiente y se purificó. Posteriormente los fragmentos se ligaron en el vector de expresión correspondiente digerido con las mismas enzimas de restricción.

Luego de transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes, estas se plaquearon en placas con medio LB-Agar suplementado con ampicilina, y se incubó a 37°C por 16 h. Se comprobó la presencia de inserto en cada vector mediante una PCR de las colonias obtenidas, utilizando los partidores correspondientes para cada vector y se seleccionó uno de cada tipo para extraer el DNA plasmidial. Con esto se obtuvieron los vectores recombinantes pMALcLip y pETLip (Tabla 9).

**Tabla 9.** Vectores recombinantes y sus características.

<b>Nombre</b>	<b>Característica</b>
pGEMAL	Gen de lipasa aislado con sitios de restricción <i>KpnI</i> y <i>HindIII</i> en pGEM-T Easy
pGET22	Gen de lipasa aislado con sitios de restricción <i>NcoI</i> y <i>XhoI</i> en pGEM-T Easy
pMALcLip	Gen codificante para lipasa en pMAL-c2E
pETLip	Gen codificante para lipasa en pET22b(+)

Se corroboró la presencia de inserto mediante la digestión de cada uno con las enzimas de restricción correspondientes (Figura 24).



**Figura 24.** Análisis de restricción de los vectores pETLip y pMALcLip.

(1) Digestión del vector pETLip con las enzimas *NcoI* y *XhoI*, (2) Digestión del vector pMALcLip con las enzimas *HindIII* y *KpnI*.

Se observa el gen de tamaño esperado de 1.300 pb y el vector pET22b(+) linearizado de 5.493 pb. Así mismo, se observa el gen del tamaño esperado de 1.300 pb y el vector pMAL-c2E linearizado de 6.646 pb.

Se utilizaron los vectores recombinantes productos de las minipreparaciones para transformar células de *E. coli* electrocompetentes. La cepa BL21(DE3) se transformó con el vector recombinante pETLip y la cepa TB1, con pMALcLip.

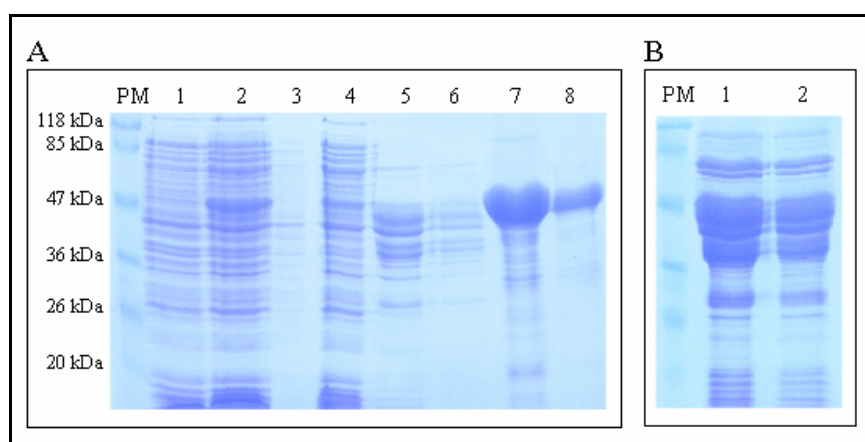
### 3.11 Producción de lipasa recombinante en *E. coli*

La producción de lipasa recombinante se realizó expresando la proteína en *E. coli* utilizando dos sistemas diferentes: BL21(DE3)/pET22b(+) y TB1/pMAL-c2E.

#### 3.11.1 Expresión utilizando el sistema de expresión *E. coli* BL21(DE3)/pET22b(+)

Se seleccionaron clones recombinantes de *E. coli* BL21(DE3) y se indujo la expresión del gen de lipasa con IPTG, como se describe en Materiales y Métodos

(sección 2.2.20.1). Con el fin de saber si la proteína se secretaba al medio extracelular, se le midió la actividad lipolítica al sobrenadante obtenido luego de la inducción. No se observó actividad en el sobrenadante, por lo que se analizaron las otras fracciones celulares. Las fracciones periplasmáticas y citoplasmáticas se analizaron en geles de poliacrilamida, donde se observó una alta expresión de una proteína del tamaño esperado de 47 kDa, mayoritariamente en la fracción insoluble (Figura 25).



**Figura 25.** Análisis electroforético de la expresión de la lipasa mediante el sistema BL21(DE3)/pET22 y su purificación parcial.

Luego del cultivo de las células bacterianas, se obtuvieron fracciones como se indica en Materiales y Métodos. A) (1) Bacterias antes de la inducción con IPTG, (2) bacterias luego de 4 horas de inducción con IPTG, (3) fracción periplásmica, (4) extracto crudo, (5 y 6) fracciones periplásmicas purificadas por columna de níquel. (7 y 8) Fracciones insolubles purificadas por columna de níquel. B) (1 y 2) Fracciones solubles purificadas por columna de níquel. PM: Marcador de masa molecular.

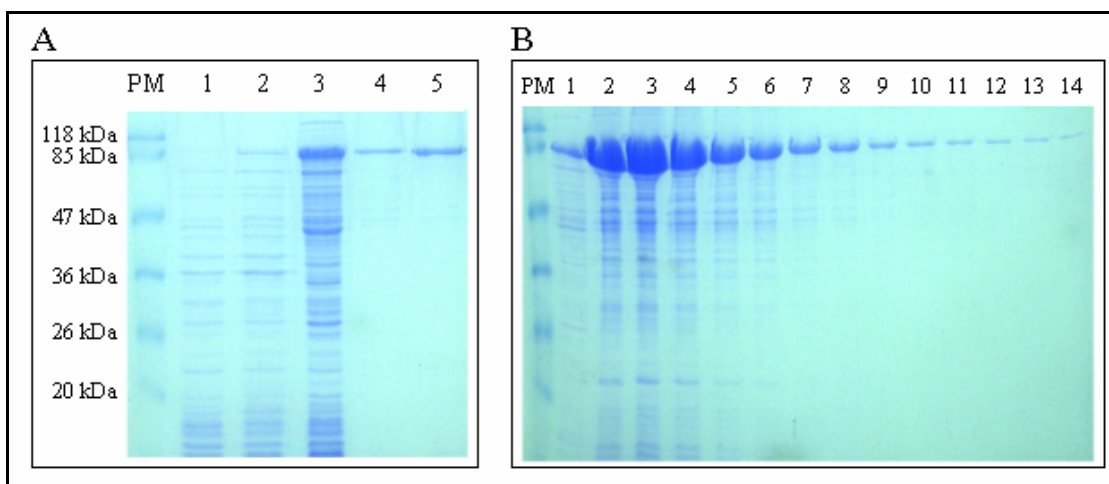
La proteína se detectó en una mayor concentración en la fracción insoluble, que corresponde al sedimento obtenido después de centrifugar la fracción citosólica, debiéndose solubilizar para su posterior purificación y caracterización.

Para saber si la lipasa obtenida de las fracciones periplásmica, soluble y solubilizada tenía actividad lipolítica, se realizaron ensayos de actividad *in situ* en geles

de poliacrilamida y líquido con *p*-nitrofenil palmitato como se indica en la sección 2.2.24. Ambos ensayos dieron negativos para las 3 fracciones. Con el fin de obtener la proteína activa, se utilizó otro sistema de expresión.

### 3.11.2 Expresión utilizando el sistema de expresión *E. coli* TB1/pMAL-c2E

Se seleccionaron clones de *E. coli* TB1 recombinantes para el gen de lipasa y se indujeron con IPTG para expresar la proteína recombinante tal como se describe en Métodos (sección 2.2.21.2). Las fracciones citoplásmica y extracto crudo obtenidas se analizaron en geles de poliacrilamida, donde se observó una alta expresión de la proteína de fusión. La lipasa quimérica tiene un tamaño de 90 kDa, que es consistente con la suma de la lipasa de 47 kDa y MBP de 43 kDa (Figura 26 A). El extracto crudo se purificó por columna de amilosa y se recolectaron 14 fracciones de 400  $\mu$ L cada una (Figura 26 B).



**Figura 26.** Análisis electroforético de la expresión y purificación parcial de la lipasa mediante el sistema pMAL-c2E.

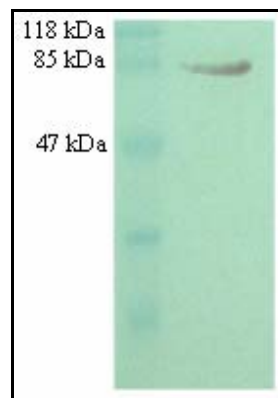
Luego del cultivo de las células bacterianas, se obtuvieron fracciones como se indica en Materiales y Métodos. A. (1) Células sin inducir, (2) células inducidas, (3) extracto

crudo, (4) extracto crudo pasado por resina de amilosa, (5) purificación de la proteína con resina de amilosa. B. Fracciones obtenidas de la purificación del extracto crudo con resina de amilosa.

Las fracciones 1-8 se juntaron debido a la alta concentración de lipasa quimérica presente en éstas y se obtuvo una solución de concentración 0,8 mg/mL.

### 3.12 Ensayos de actividad lipolítica y caracterización de la lipasa quimérica

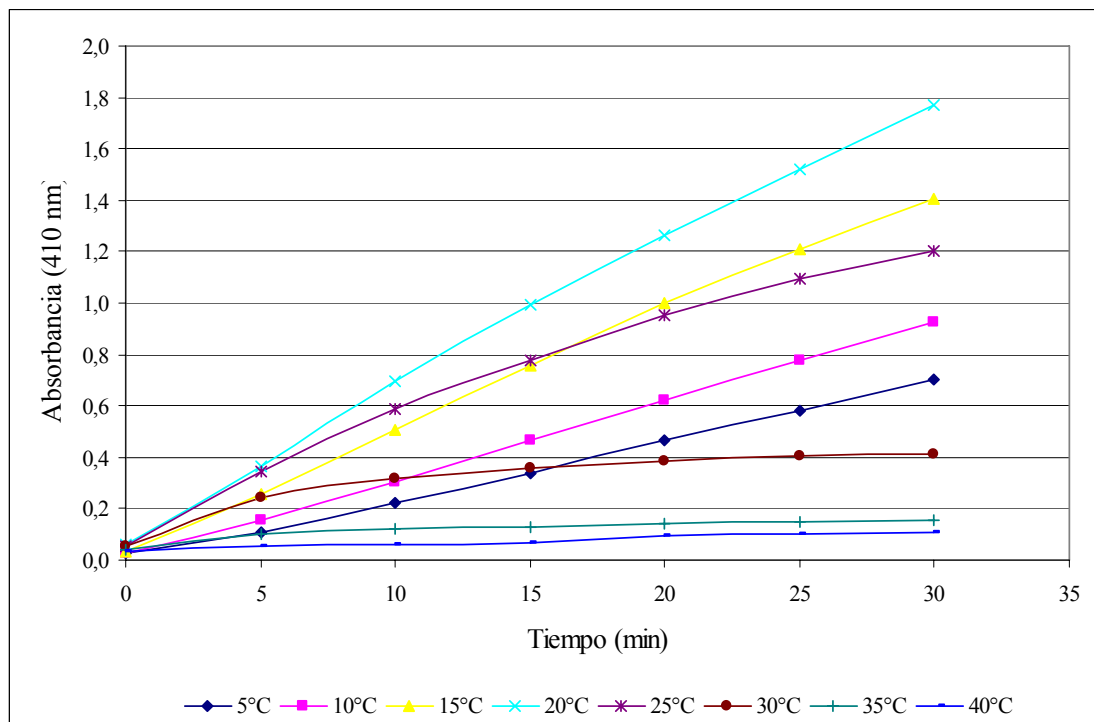
Se realizaron ensayos de actividad lipasa a la proteína de fusión. Se hizo un ensayo de actividad lipolítica *in situ* en un gel de poliacrilamida, en el que se distinguió claramente una banda activa del tamaño esperado de 90 kDa (Figura 27).



**Figura 27.** Ensayo de actividad lipolítica *in situ* para la lipasa quimérica.

Se observa una banda de actividad lipolítica a aproximadamente 90 kDa. El sustrato utilizado fue  $\alpha$ -naftilacetato.

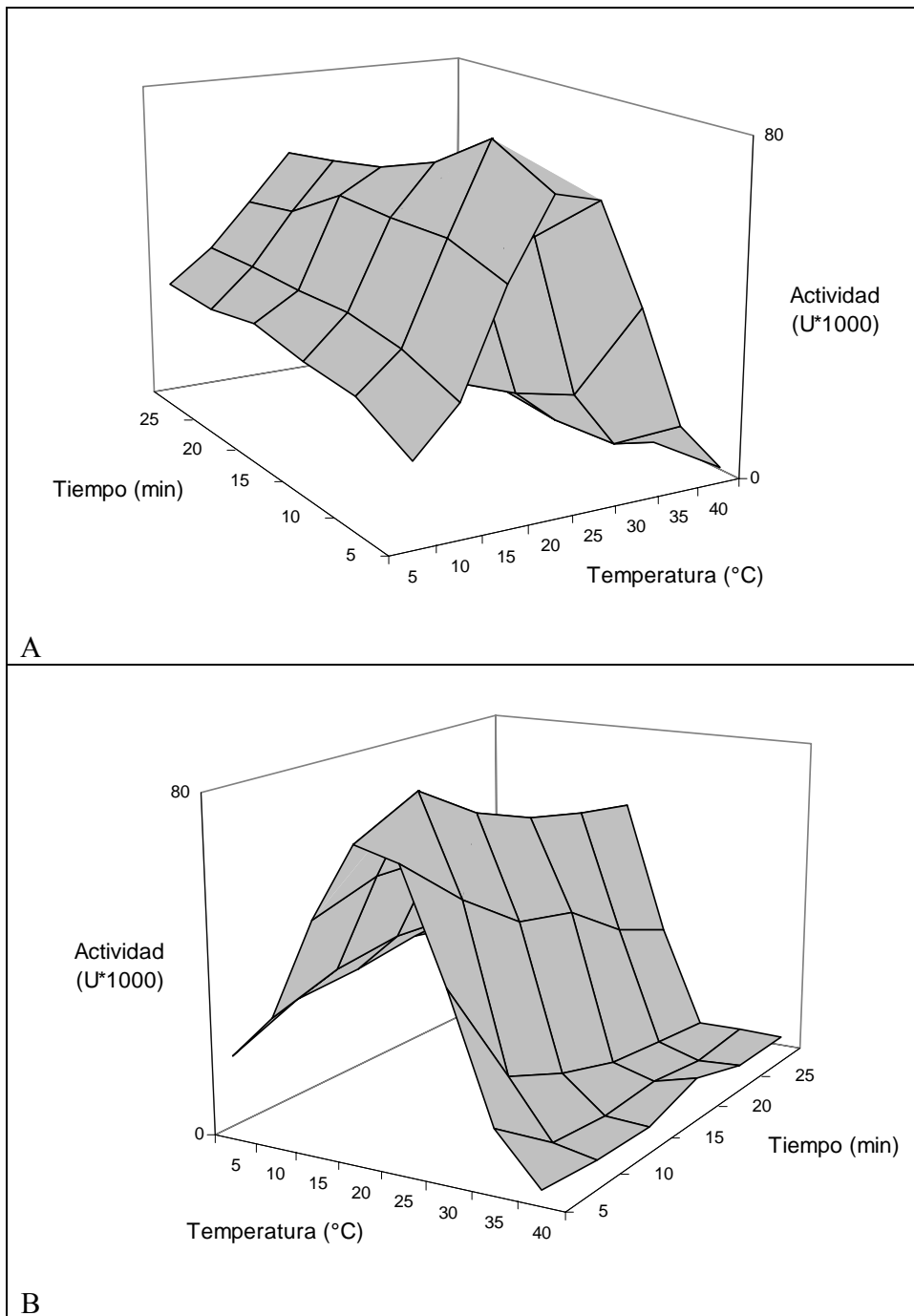
Con el fin de caracterizar a la enzima según su actividad a temperaturas bajas, se realizaron ensayos de actividad en líquido a diferentes temperaturas, según se describe en la sección 2.2.24.2. El ensayo se realizó durante 30 min (Figura 28).



**Figura 28.** Curvas de progreso a diferentes temperaturas.

Si se consideran 30 minutos de ensayo, se observa un máximo de actividad lipolítica a los 20°C en las condiciones ensayadas. A los 40°C se pierde casi por completo la actividad de la proteína.

Con el fin de determinar la actividad de la lipasa a cada temperatura se prosiguió como se detalla en Métodos. Debido a que la enzima no fue preincubada a la temperatura del ensayo, se realizó un gráfico de actividad en función del tiempo para cada temperatura con el propósito de determinar la actividad de la proteína en fase estacionaria (Figura 29).

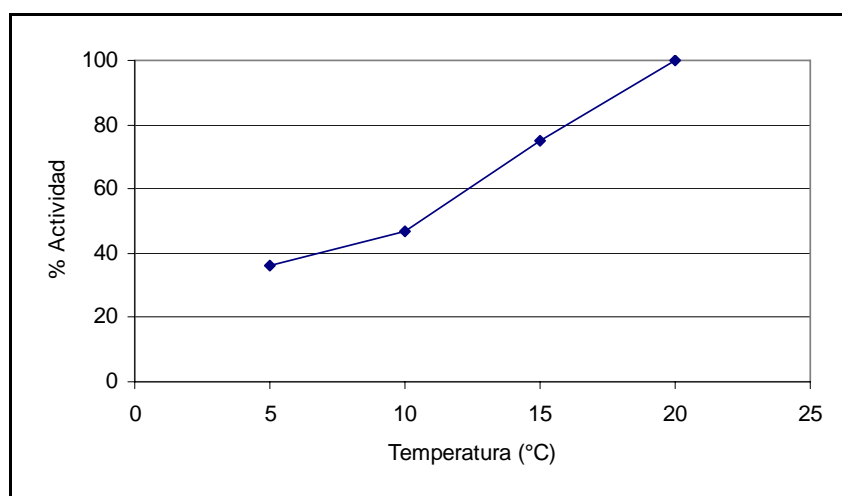


**Figura 29.** Dependencia de la temperatura en la actividad lipolítica.

Se observa la variación de la actividad enzimática con la temperatura (5-40°C) y el tiempo (5-30 min) durante el ensayo de actividad lipolítica. A. perfil para las temperaturas 5-20°C y B. perfil para las temperaturas 20-40°C.



Para temperaturas de 5 y 10°C se tomó como valor de la actividad la obtenida en promedio durante los 30 min de ensayo debido a que se mantiene constante. Para los 15°C se tomó el valor promedio de los primeros 20 min de ensayo que corresponden a la velocidad inicial de la enzima. A los 20°C se tomó la actividad medida hasta los 10 min como la velocidad inicial. Del gráfico de la figura se desprende que a partir de los 25°C la proteína comienza a inactivarse a medida que pasa el tiempo. Por lo tanto, a temperaturas mayores a los 25°C no fue posible determinar la actividad a la cual se estabiliza la proteína llegando a su estado estacionario, debido a que se observa solo la inactivación de ésta. Por esta razón, sólo se pudo determinar la actividad de la lipasa a temperaturas menores. Se tomo la actividad calculada a 20°C como el 100% de actividad. Los resultados se muestran en la Figura 30.

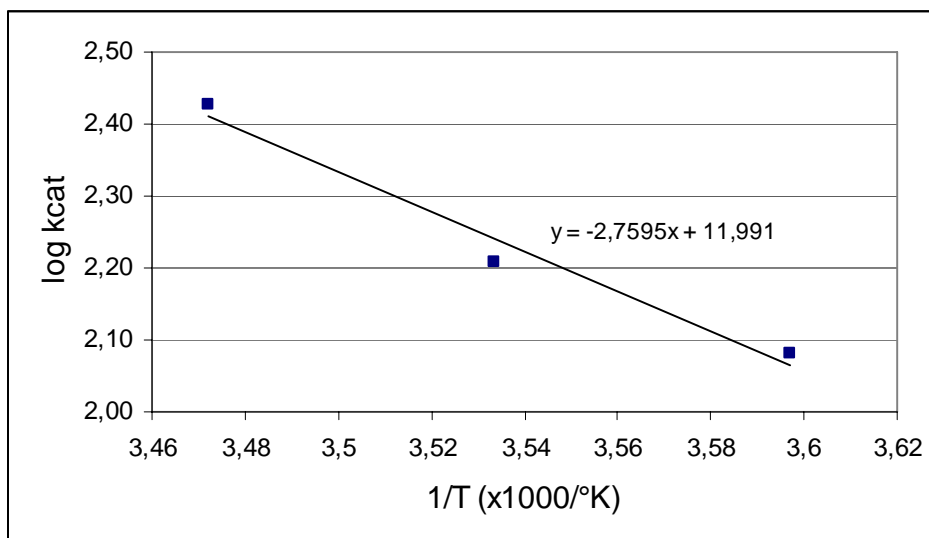


**Figura 30.** Efectos de la temperatura en la actividad hidrolítica de la lipasa.

Se observa que el 100% de la actividad se obtiene a una temperatura de 20°C. A los 5°C, la lipasa está activa en un 35%.

Para determinar la actividad específica de la lipasa quimérica se realizó una aproximación de la concentración real de la proteína en la solución. Para esto, se utilizó

el programa Gel-Pro Analyzer. Se obtuvo que las bandas correspondientes a la lipasa quimérica representaban en promedio un 40% del total de la proteína en el gel, lo que correspondía a una concentración real de proteína de fusión de 0,32 mg/mL. Como se utilizaron 100  $\mu\text{L}$  de una solución de enzima a una concentración de 0,32  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y el volumen final de la reacción fue de 1.600  $\mu\text{L}$ , la concentración de la proteína en el ensayo fue de 0,02  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Sabiendo que el tamaño de la proteína quimérica era de 90 kDa (MBP más lipasa), se determinó que la enzima estaba a una concentración de  $2,22 \cdot 10^{-4}$   $\mu\text{mol}/\text{mL}$ . Con este valor se determinó la  $k_{\text{cat}}$  de la enzima para los 5, 10 y 15°C. Finalmente se calculó la energía de activación de la lipasa quimérica mediante un gráfico de Arrhenius (Figura 30).



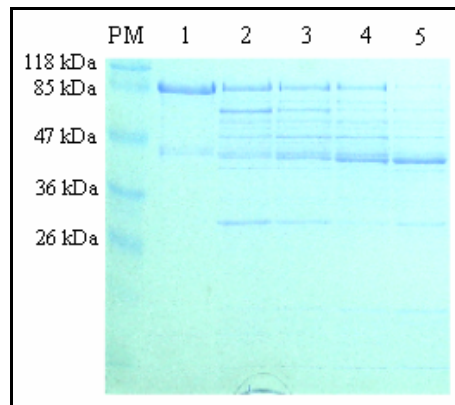
**Figura 31.** Gráfico de Arrhenius para la lipasa quimérica.

De la pendiente del gráfico de Arrhenius se pudo determinar la energía de activación de la proteína de fusión.

El gráfico de Arrhenius muestra una curva cuya pendiente es  $-2,76 \cdot 10^3$  °K. Con este valor se determinó que la energía de activación para la lipasa es de de 5,5 kcal/mol entre 5°C y 15°C a pH 8 y en las condiciones ensayadas.

### 3.13 Separación de la lipasa de la MBP

Con el fin de separar la proteína de interés de la MBP, se hicieron pruebas de digestión con enteroquinasa. (Figura 31).



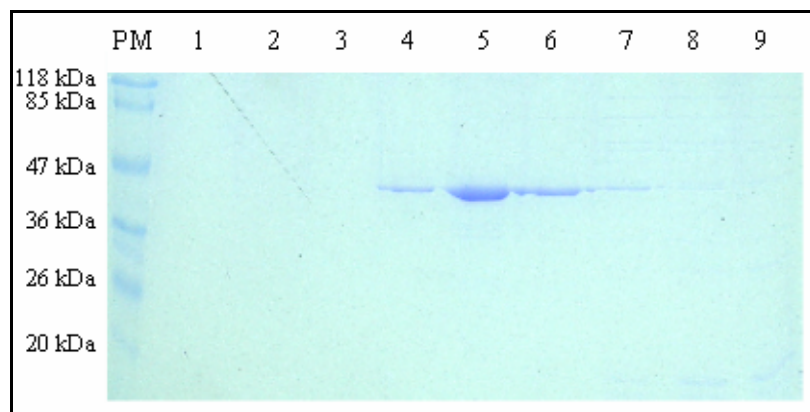
**Figura 32.** Digestión de la lipasa quimérica con enteroquinasa.

Se hicieron pruebas de digestión con enteroquinasa a diferentes tiempos de incubación (1) 0 hrs, (2) 2 hrs (3) 4 hrs (4) 8 hrs (5) 17 h.

A medida que pasaban las horas de digestión se detectó una disminución de la lipasa quimérica, y un aumento de la MBP correspondiente a la banda de 43 kDa. Sin embargo, no se observó un aumento en la lipasa de 47 kDa. Se advierte que a las 17 h la lipasa quimérica desaparece completamente.

Para comprobar si la banda observada de 47 kDa correspondía a la lipasa con actividad lipolítica, se realizó una mezcla de digestión de mayor volumen y se digirió durante 8 h con el fin de separar la proteína de interés mediante una cromatografía de

intercambio iónico. Se recolectaron 23 fracciones que se concentraron mediante centrifugación y se analizaron en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes (Figura 32).



**Figura 33.** Fracciones recolectadas de la cromatografía de intercambio iónico.

Se muestran las fracciones recolectadas de la 9 (carril 1) a la 17 (carril 9).

Sólo se observan bandas entre las fracciones 12 a 15. Debido al tamaño o masa molecular de ésta proteína se piensa que corresponde a MBP y no a la lipasa. Para confirmar esta proposición, se hizo un ensayo de actividad lipolítica en un gel de poliacrilamida, el cual resultó negativo.

#### 4. DISCUSIÓN

---

##### Diseño de partidores y búsqueda de la secuencia parcial de un gen codificante para lipasa

Con el propósito de amplificar la secuencia parcial de un gen codificante para lipasa fue necesario realizar un estudio acerca de las diferentes clases de lipasas existentes debido a que las referencias indican una baja similitud entre las secuencias (Cygler y col., 1993; Jaeger y col., 1994; Jaeger y col., 1999; Pleiss y col., 2000). Se realizaron múltiples alineamientos de secuencias aminoacídicas de lipasas bacterianas del grupo IV o HSL que está referido como el grupo al cual pertenecen las lipasas activas a bajas temperaturas (Jaeger y col., 1994). Se logró encontrar 3 secuencias de aminoácidos altamente conservadas, de las cuales dos de ellas concordaban con lo descrito en la literatura (Kanaya y col., 1998; Arpigny & Jaeger, 1999; Jaeger y col., 1999). De acuerdo a estos antecedentes se diseñaron partidores degenerados y específicos. De hecho, con éstos últimos se obtuvo un mejor resultado con respecto al tamaño de bandas esperadas. Así, se eligieron 5 fragmentos para secuenciar. En la Figura 11A, que muestra la amplificación mediante PCR con los partidores LF1 y LR1, se observa sólo una banda del tamaño esperado de 240 pb, correspondiente al amplificado de la cepa 2-17. Sin embargo, había una banda de aproximadamente 400 pb que se repetía, por lo que resultaba interesante secuenciar. En la figura 11 B, que muestra la amplificación mediante PCR con los partidores LF1 y LR2, se detectó un producto de amplificación que se repetía a aproximadamente 900 pb en la mayoría de las

cepas, no obstante, del tamaño esperado sólo se identificó una banda de aproximadamente 650 pb de la cepa 1-9, pero no tan abundante como las anteriores por lo que se omitió. En la Figura 11C, que muestra la amplificación mediante PCR con los partidores LF2 y LR2, sólo se advierte una banda del tamaño esperado, de aproximadamente 300 pb amplificado desde la cepa 2-17, y una de 450 pb muy marcado que se repetía en varias cepas. Debido a todo lo anterior, se seleccionó la cepa 2-17 para realizar las amplificaciones definitivas con el fin de secuenciar los fragmentos (Figura 11 D). Además esta cepa bacteriana se destacó por secretar una mayor cantidad de lipasas o de mayor actividad a baja temperatura al realizar el ensayo en placa (Figura 8).

De los 5 fragmentos secuenciados, sólo 1 resultó ser la secuencia parcial de un gen codificante para lipasa, justamente el amplificado con los partidores específicos diseñados a partir de las secuencias aminoácidas altamente conservadas descritas en la literatura.

En la Figura 11 se observan bandas difusas y menos marcadas en amplificaciones que utilizaban como templado el DNA de otras cepas, las que no fueron secuenciadas y que podrían ser fragmentos de genes codificantes para lipasas. Con el fin de encontrar nuevos fragmentos de genes codificantes para lipasas en otras cepas bacterianas, sería interesante obtener productos de amplificación más definidos, lo cual resultaría variando las condiciones del PCR en cuanto a número de ciclos, temperatura de alineamiento y tiempos de elongación.

Se logró amplificar a partir del DNA genómico de la cepa bacteriana 2-17 un fragmento de 240 pb que codifica para un péptido de 80 aminoácidos, cuya secuencia se analizó mediante Blastx. Se encontró que la secuencia de aminoácidos tenía un 96% de

identidad con la secuencia parcial de la Lipasa 2 de *Moraxella sp.* (Feller & col., 1991), un 79% de identidad con la secuencia parcial de la lipasa de *Psychrobacter sp.* St 1 (Kulakova & col., 2000) y un 75% de identidad con la secuencia parcial de la lipasa de *Psychrobacter cryohalolentis* K5 (Copeland & col., sin publicar), todos con valores E muy bajos. Asimismo, la secuencia contiene los péptidos altamente conservados descritos en las publicaciones con esta materia. Esto confirmaría que el fragmento nucleotídico encontrado de 240 pb sería una secuencia parcial de un nuevo gen de lipasa, que pertenecería a la familia de lipasas bacterianas del grupo HSL en el cual se encuentran las lipasas activas a bajas temperaturas.

Para conocer el género al cuál pertenecía la cepa 2-17 y así relacionarlo con la producción de proteínas adaptadas a bajas temperaturas, se secuenció parcialmente el DNAr 16S de la cepa bacteriana y se construyó un árbol filogenético. Éste identificó a la cepa como un *Psychrobacter* perteneciente a la familia *Moraxellaceae*. Es posible que la distancia filogenético sea aún menor, debido a que el análisis se realizó con la secuencia parcial del DNAr 16S, lo que hace que aparezca un poco más alejado en el árbol.

Búsqueda de las secuencias río arriba y río abajo del gen codificante para lipasa mediante un método de *genome walking* estandarizado en el laboratorio.

El método de *genome walking* consiste en la identificación sistemática de regiones desconocidas adyacentes a una secuencia de DNA conocida (Nthangeni y col., 2004; Rishi y col., 2004). El aislamiento de las regiones adyacentes desconocidas se puede obtener mediante la búsqueda en una librería genómica con una sonda de DNA conocida. Sin embargo, el procedimiento requiere mucho tiempo (Rishi y col., 2004). Se

han aislado muchos genes de lipasas mediante librerías genéticas, en que una sonda oligonucleótida específica para lipasas puede ser utilizada para buscar clones positivos, sin embargo, significa mucho trabajo y la detección clones pseudopositivos que no contienen el gen completo de lipasa. Asimismo, la búsqueda de clones positivos mediante indicadores fluorescentes, basado en que la lipasa secretada por los clones positivos son funcionales, es un método útil y sensible, aunque no funciona si las lipasas no son secretadas de forma funcional (Jiang, 2005). El uso de técnicas de PCR para aislar regiones adyacentes desconocidas de una secuencia de DNA conocida se ha hecho popular debido a la eficiencia y rapidez del método y a que son técnicas menos laboriosas (Kilstrup & Kristiansen, 2000; Nthangeni y col., 2004; Rishi y col., 2004). Estas técnicas incluyen PCR inverso (Triglia y col., 1998), PCR vectorete (Riley y col., 1990) y PCR mediante la ligación de un adaptador o casete (Kilstrup & Kristiansen, 2000). Todas ellas se basan en reacciones de ligación donde la secuencia de DNA conocida parcialmente es, respectivamente, ligada contra ella misma, al vectorete, o al casete, lo que resulta en que el fragmento conocido es flanqueado por secuencias de DNA conocidas permitiendo el diseño de partidores convergentes que utilizan el producto de ligación como templado para las amplificaciones de PCR convencionales. Sin embargo, hay múltiples factores responsables de la alta tasa de fracaso de las PCR que utilizan la ligación de vectoretos o casetes, los que incluyen: la dependencia de un mapa de restricción favorable alrededor de la secuencia conocida, una eficiencia de apareamiento reducida y la recuperación del casete apareado, una eficiencia de ligación baja entre el casete y los fragmentos de restricción blancos, y dificultades técnicas (Nthangeni y col., 2004). Como solución se han creado casetes que incluyen



oligonucleótidos de doble hebra de DNA desfosforilados con diferentes sitios de restricción cohesivos, sin embargo, éstos dependen de la utilización de las enzimas de restricción presentes en el casete, lo que puede ser una desventaja si ellos se encuentran dentro de las regiones adyacentes al gen. Por esto se ideó un método de *genome walking* que mantiene la base de la PCR que utiliza la ligación de un adaptador, pero aprovecha la complementariedad de T y A entre el adaptador y el fragmento de restricción. La base de este método se encuentra en el diseño y construcción de un adaptador de doble hebra de DNA con una timidina desapareada en su extremo 3', capaz de unirse mediante clonamiento TA al fragmento de restricción que contiene el gen deseado con una adenina desapareada en el mismo extremo, producto de una elongación previa de los extremos cohesivos producidos por la enzima de restricción utilizando la *Taq* DNA polimerasa. Puesto a que no se conocen los tamaños de los fragmentos de restricción producidos donde se encuentra el gen de lipasa, se utilizó la Elongasa® en lugar de la *Taq* polimerasa para la PRC final que amplifica los extremos del gen, debido a que es capaz de amplificar fragmentos de mayor tamaño.

Mediante esta técnica estandarizada en el laboratorio fue posible aislar un nuevo gen de lipasa a partir de una bacteria de origen marino antártico identificada como un *Psychrobacter sp.* Asimismo se obtuvo la región promotora del gen y la secuencia río abajo de éste. Con el fin de corroborar la técnica se realizó una hibridación southern utilizando como sonda el fragmento de 240 pb secuenciado con anterioridad y a partir del cual se diseñaron los partidores para amplificar las secuencias adyacentes. La hibridación southern identificó un fragmento de 2.300 pb que corresponde al tamaño del fragmento de digestión que contiene el gen codificante para lipasa.

Se pudo reconstruir una secuencia de DNA de 2.300 pb. En este constructo se encontró un ORF de 1.293 pb, que codifica para 431 aminoácidos. A nivel de secuencia aminoacídica se encontró un 89% de identidad a la lipasa 2 de *Moraxella sp.* (Feller y col., 1991), un 55% de identidad a una esterasa de *Psychrobacter sp.* Ant300 (Kulakova y col., 2004) y un 51% de identidad a la lipasa de *Psychrobacter sp.* St1 (Kulakova y col., sin publicar). También, se construyó un árbol filogenético (Figura 21) basado en las secuencias de aminoácidos de las primeras 20 proteínas de origen bacteriano arrojadas por el algoritmo Blast psi más similares en secuencia de la lipasa encontrada. Este árbol muestra claramente la cercanía en distancia filogenética que tiene la nueva lipasa con la lipasa 2 de *Moraxella sp.* y con las lipasas del género *Psychrobacter*.

Al analizar la secuencia de la proteína se pueden destacar varias zonas que revelan la posible existencia un nuevo gen codificante para lipasa perteneciente al grupo IV de lipasas bacterianas. En base a la actividad lipolítica, probablemente esta lipasa utiliza la triada catalítica característica (Ser-His-Asp). Además contiene un agujero oxianiónico para estabilizar el intermediario tetraédrico durante las etapas de acetilación y desacetilación. Se distingue el pentapéptido conservado GDSAG, en donde la serina central (Ser<sup>238</sup>) sería probablemente un miembro de la triada catalítica (Choo y col., 1998) y el aspartato (Asp<sup>237</sup>) formaría parte del agujero oxianiónico (Pleiss 2000, Fischer & Pleiss, 2003). La secuencia también contiene otra región altamente conservada HGGG, en que la tercera glicina (Gly<sup>168</sup>) formaría parte del agujero oxianiónico (Pleiss 2000, Fischer & Pleiss, 2003). En otra región conservada se encontraría el segundo aminoácido perteneciente a la triada catalítica (Asp<sup>361</sup>), que se conserva de forma frecuente en las lipasas del grupo IV. Finalmente, el tercer

aminoácido de la triada catalítica es una histidina. Se ha descrito en la literatura que es un aminoácido altamente conservado que generalmente está seguido por una glicina (Choo y col., 1998). En esta secuencia se encuentran dos histidinas (His<sup>165</sup> e His<sup>391</sup>) que cumplen con estos requisitos. Sin embargo, por antecedentes de que éste residuo se ubica en un “loop” después de la hebra  $\beta_8$  del plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa y siempre es el tercero en la secuencia aminoacídica, probablemente la His<sup>391</sup> formaría parte de la triada catalítica.

#### Análisis de la secuencia río arriba del gen de lipasa

Los componentes celulares de las bacterias adaptadas a bajas temperaturas deben estar adaptados para permitir al organismo vivir y crecer. Procesos celulares fundamentales como el metabolismo, la replicación, transcripción y traducción también deben estarlo. El paso crucial en la expresión de genes y su regulación es el inicio de la transcripción (Duilio y col., 2004). La transcripción está regulada por interacciones proteína-secuencias específicas de DNA. La regulación depende de la presencia de elementos que actúan en *cis* con respecto al ORF, siendo un ejemplo los promotores (Sivaraman y col, 2005). En procariontes, el promotor es el sitio adyacente al extremo 5' del gen, al cual se une la RNA polimerasa para iniciar la transcripción (Dale, 1998). Existen estudios sistemáticos sobre las secuencias de regiones promotoras en procariontes mesófilos que han permitido definir secuencias consenso para la expresión de genes en estos organismos. La mayoría de ellas tiene una secuencia similar, estableciéndose un consenso TTGACA y TATAAT para las regiones -35 y -10, respectivamente. La naturaleza de las secuencias -10 y -35 y la distancia que las separa, afecta la eficiencia de un promotor específico. Conocer la ubicación y la secuencia de

estas dos regiones para un gen determinado es un gran desafío, debido a que los promotores pueden diferir mucho entre secuencias y aún así, conservar su función. Su reconocimiento y análisis puede ser de gran importancia, puesto que es una secuencia de DNA que afecta la frecuencia y localización del inicio de la transcripción mediante la interacción con la RNA polimerasa (Harley & Reynolds, 1987). Sin embargo, muy poco se conoce de promotores en organismos psicrófilos. El primer estudio sobre este tema fue realizado por Duilio y col. en el año 2004, quienes propusieron una secuencia consenso para promotores de *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 en base a una comparación entre 11 regiones promotoras activas de la bacteria psicrófila. Ellos identificaron dos secuencias consenso de 6 nucleótidos, representando las regiones putativas -10 y -35. La región -10 se posiciona 4-12 pb río arriba del inicio de la transcripción y la secuencia consenso mostró ser TATRAY, siendo las posiciones uno, tres y cinco las más conservadas (100%, 81% y 72% respectivamente). El espaciador entre las regiones -10 y -35 varía entre 14 y 19 pb. La secuencia consenso para la región -35 se estableció como TRGRTW. Ambas regiones mostraron ser muy similares a la secuencia promotora  $\sigma^{70}$ -dependiente identificada en *E. coli*, destacando la fuerte similitud entre las señales transcripcionales psicrófilas con las contrapartes de *E. coli*. En base a este estudio reportado se analizó la región promotora del gen de lipasa realizando una comparación entre los 11 promotores reportados y la secuencia río arriba del gen de lipasa obtenida. En la Figura 22 se muestra el alineamiento observándose que la potencial región promotora se encontraría 62 pb río arriba del codón de inicio ATG del gen codificante para lipasa, y el espaciador entre las regiones consenso sería de 18 pb. Tanto la región -10 y -35 coinciden en un 100% con la región consenso propuestas por

Duilio y col. Cabe destacar que tanto *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 como la cepa *Psychrobacter* son bacterias gram negativas y pertenecen a la misma clase en su clasificación taxonómica. Por otro lado, la región -10 coincide en 5 de los 6 nucleótidos propuestos como región consenso en *E. coli*, siendo el disidente reportado como el nucleótido con menos porcentaje de conservación. No es posible predecir con exactitud si esta región es en realidad el promotor del gen, debido a que sólo hay un estudio sobre esta materia con promotores de una misma especie bacteriana. Sin embargo puede ser un aporte en el estudio por clarificar estrategias involucradas en bacterias psicrófilas para lidiar con los cambios ambientales. La única forma de determinar si la región encontrada es el promotor del gen sería realizar mutaciones de éste en las secuencias conservadas y comparar la fuerza a nivel de la transcripción. En general, cada gen debe tener un promotor, sin embargo, los genes bacterianos pueden ser parte de una unidad de transcripción conocida como operón. Todo el operón es transcrito, desde un sólo promotor, en una molécula larga de RNAm, desde la cual cada una de las proteínas se traduce separadamente. Por lo tanto, la regulación transcripcional se aplica al operón como un todo (Dale, 1998). Según lo anterior, otra opción es que el gen de lipasa forme parte de algún operón. Para saber si esta alternativa es correcta, habría que seguir secuenciando río arriba y río abajo del gen y analizar la secuencia en busca de algún otro ORF en el mismo marco de lectura. Asimismo, se pueden hacer ensayos de actividad lipolítica de cultivos de la cepa original, de la cual se aisló el gen. Si su nivel de expresión es constante, la lipasa podría ser constitutiva, lo cual sería un indicio de que la enzima es expresada bajo el control de su propio promotor.

### Producción de lipasas recombinantes

El gen codificante para lipasa se expresó en células *E. coli* BL21(D3E), utilizando el vector pET22b(+). Se observó expresión de la proteína del tamaño esperado en todas las fracciones, detectándose en una mayor concentración de forma insoluble. Las lipasas recombinantes solubles producidas en *E. coli* mediante el sistema de expresión BL21(D3E)/pET22b(+) no mostraron actividad lipolítica al probar dos ensayos diferentes. En el gel de proteínas de la Figura 25 se observa que no hay una banda definida a 47 kDa en la fracción soluble, si no más bien difusa. En las publicaciones se señala que el plegamiento de proteínas y la degradación proteolítica están íntimamente relacionados con que el catabolismo sea una forma eficiente de conservar los recursos celulares, reciclando proteínas que no han sido plegadas correctamente o que han sido dañadas de manera irreversible en sus aminoácidos constitutivos (Baneyx, 1999). Por lo tanto, una posible razón para la inactividad lipolítica de la fracción soluble sería la degradación de la lipasa en el citoplasma debido a un mal plegamiento. Por otro lado, la fracción periplásmica muestra una banda tenue de 47 kDa. Sin embargo, los ensayos de actividad lipolítica resultaron negativos. Se sabe que el periplasma es un ambiente oxidativo que contiene enzimas que catalizan la formación de puentes disulfuro y, por ende, es un destino atractivo para la producción de proteínas recombinantes. Pese a esto, una ineficiente secreción conllevaría a la formación de cuerpos de inclusión (Baneyx, 1999). Asimismo, la proteína se produjo en grandes cantidades de forma insoluble como cuerpos de inclusión en el citosol. Se ha descrito ventajas sobre la formación de los cuerpos de inclusión como: la proteína es protegida de degradación proteolítica resultando en mayor proporción, y resguarda a la

célula contra la toxicidad de la proteína recombinante, debido a que los cuerpos de inclusión no tienen actividad biológica. Por último, pueden ser acumulados en el citoplasma en un mayor proporción que cuando se produce de forma soluble (Mattsson & Tenhunen, 2003). Los cuerpos de inclusión se pueden formar debido a que las diferentes proteínas requieren distintas condiciones para su correcto plegamiento (Armstrong y col., 1999). Sin embargo, al solubilizar los cuerpos de inclusión con el fin de que se replegaran de forma correcta, no se observó recuperación en la actividad lipolítica. Esto se puede deber a que hay muchos factores que afectan el correcto plegamiento de las proteínas recombinantes, por lo tanto al momento de solubilizar los cuerpos de inclusión se deberían hacer pruebas de parámetros, como la concentración de proteína, la catálisis de la formación de puentes disulfuro, la temperatura, el pH y la fuerza iónica de ingredientes específicos del solvente. (Rudolph & Lilie, 1996). Finalmente, otra posible forma de mejorar el plegamiento de la proteína recombinante es modificar la secuencia de la proteína.

Ante la imposibilidad de producir lipasa recombinante de forma soluble y activa, se tuvo que probar la expresión mediante otro sistema. Muchas lipasas han sido reportadas de requerir una proteína chaperona para su correcto plegamiento y secreción de una proteína activa (Jaeger, 1999). Asimismo se ha demostrado que la coexpresión de los genes de lipasa más el de la chaperona ha sido exitoso (Quyen y col., 1999). Por otra parte se ha comprobado que las proteínas de fusión podrían mejorar enormemente la solubilidad de la proteína pasajera que si no se acumularían como cuerpo de inclusión en el citoplasma celular, además su purificación se vería simplificada debido a que se permitiría una cromatografía de afinidad a la molécula fusionada (Baneyx, 1999;

Koschorreck y col., 2005). La razón más probable del mejoramiento del plegamiento es que el compañero de fusión alcanza rápida y eficientemente una conformación nativa en cuanto emerge del ribosoma y promueve la adquisición de una correcta estructura en las unidades de plegamiento río abajo, favoreciendo reacciones de isomerización (Baneyx, 1999). Por esto, se pensó que la producción de una proteína de fusión, podría ayudar a obtener la lipasa de forma soluble y activa. Para elegir un sistema de expresión mediante proteína de fusión se hizo una revisión bibliográfica y se encontró un estudio en el que se comparó la habilidad de 3 compañeros de fusión (MBP, GST y TRX) de inhibir la agregación de diversas proteínas que normalmente se acumulaban de forma insoluble. Encontraron que MBP fue por mucho la más efectiva como agente solubilizador. Asimismo, fue capaz de promover el plegamiento correcto de la proteína pasajera a su conformación biológicamente activa (Kapust & Waugh, 1991). Por otro lado, se ha propuesto que MBP interactuaría directamente con la proteína, actuando como chaperona intramolecular (Baneyx, 1999). Un estudio demostró que sólo mediante la producción de proteínas de fusión para proteinasas aspárticas de mamíferos con MBP, las proteínas fueron solubles en *E. coli*, sino formaban cuerpos de inclusión (Sachdev & Chirgwin, 1998). Debido a todos estos antecedentes, se eligió el sistema de expresión TB1/pMALc2E. Este sistema se basa en que el gen clonado se inserta en el sitio múltiple de clonamiento río abajo del gen *malE* que codifica para la proteína de unión a maltosa (MBP), lo que resulta en la expresión de una proteína de fusión a MBP. Mediante este sistema de expresión fue posible obtener una proteína recombinante fusionada a MBP, a la que se denominó lipasa quimérica la cual contenía actividad lipolítica.



### Actividad lipolítica de la lipasa quimérica

Se realizaron ensayos de actividad lipolítica en líquido a diferentes temperaturas utilizando *p*-NFP como sustrato con el fin de caracterizar a la lipasa según su actividad a bajas temperaturas. En la Figura 28 se muestra la curva de progreso obtenida para cada temperatura, se observa que durante los 5 primeros minutos del ensayo existe una fase *lag* en que la lipasa adquiere un cambio conformacional para pasar de su forma inactiva a la activa en contacto con la interfase lípido-agua. Por lo tanto, para conocer la actividad de la proteína para cada temperatura ésta se determinó en su estado estacionario, cuando la concentración del complejo enzima-sustrato no cambia. Al observar las curvas de progreso para cada temperatura, no se distingue con claridad el estado estacionario, representado por la parte lineal de la curva. Con el propósito de determinarlo, se calculó la actividad de la proteína a partir de las pendientes del gráfico de progreso cada 5 min y luego se graficó para cada temperatura la actividad de la proteína en función del tiempo, sin tomar en cuenta los primeros 5 min de fase *lag*. En la Figura 29 se puede observar que a los 5 y 10°C la enzima mantiene su actividad constante en el tiempo, sin tomar en cuenta los primeros minutos de fase *lag*, encontrándose en su estado estacionario. A los 15°C la enzima mantiene su estado estacionario hasta los 20 min de ensayo, luego de este tiempo comienza a perder actividad. Al realizar el ensayo a 20°C, la lipasa aumenta su actividad durante los primeros 10 min de ensayo, tiempo en el cual alcanza su actividad máxima estable. A los 25°C, la enzima no tiene un estado estacionario claro y la actividad va disminuyendo con el tiempo. Pasado el tiempo del equilibrio del complejo enzima-sustrato pueden ocurrir dos cosas: que la aparición de producto influya en la actividad de la enzima o que

la enzima se comience a inactivar. En los ensayos de actividad lipolítica a 30, 35 y 40°C se puede observar que la actividad correspondiente a los 5 min de ensayo disminuye considerablemente a medida que pasa el tiempo. Debido a que la enzima no se preincubó a la temperatura del ensayo lo que pudo ocurrir es que la actividad determinada para los primeros 5 min de ensayo no sea la correcta, debido a que la enzima se encontraba a 0°C en un principio y por lo tanto lo que se observa en el ensayo corresponde a la desactivación de la enzima y no la activación. La actividad para estas temperaturas no se pudo determinar de forma correcta. Para determinar los valores de actividad de la proteína para temperaturas mayores a los 25°C primero se debería preincubar la enzima a la temperatura del ensayo y luego medir la actividad a tiempos muy pequeños con el fin de determinar la actividad durante la activación y estabilización de la proteína y no durante su denaturación e inactivación.

Se puede decir que para las condiciones ensayadas, la lipasa comienza a denaturarse a los 25°C y ya es severa a los 35°C. Esto es común en enzimas activas a bajas temperaturas, como un mecanismo de adaptación es el aumento de flexibilidad de la proteína, al aumentar la temperatura, los átomos de la molécula adquieren una mayor energía y una mayor tendencia al movimiento. Eventualmente adquieren la energía suficiente para sobrellevar las interacciones débiles que mantienen la estructura terciaria de la proteína con su subsecuente desactivación.

Se observa una actividad lipolítica máxima a los 10 min de ensayo a 20°C y una alta actividad a 5°C. Se detectó que sólo a las temperaturas más bajas de 5 y 10°C la actividad lipolítica es continua en el curso del tiempo manteniéndose constante. Esto demuestra que la enzima es muy termolábil. Esta es una característica de las enzimas

activas a bajas temperaturas (Gerday y col., 2000; Gianese y col., 2001; Cavicchioli y col., 2002).

Para determinar la energía de activación de la lipasa, se determinó la  $k_{cat}$  de la enzima para los 5, 10 y 15°C, debido a que a temperaturas mayores la enzima se comienza a inactivar. Según los resultados, el gráfico de Arrhenius muestra una energía de activación calculada de 5,5 kcal/mol entre los 5 y 15°C para la hidrólisis de *p*-nitrofenil palmitato catalizada por la lipasa. Las energías de activación de las proteínas adaptadas a bajas temperaturas son menores que las mesófilas. Según se describe en la literatura sobre esta materia la energía de activación de la lipasa M37, activa a bajas temperaturas, es de 2,07 kcal/mol para la hidrólisis de aceite de oliva, mientras que la de su contraparte mesófila es de 12,1 kcal/mol (Ryu y col., 2005). Algo similar ocurre con la esterasa AEST, obtenida a partir de *Acinetobacter sp.* Cepa No. 6, en que la energía de activación calculada para la hidrólisis de *p*-nitrofenil butirato resultó ser de 9 kcal/mol, mientras que la de esterasas mesófilas eran de 28,4 kcal/mol y 21,0 kcal/mol (Suzuki y col., 2002). En este caso no se pudo hacer una comparación con una lipasa mesófila a nivel experimental, debido a que sólo se disponía de lipasas comerciales mezcladas con otros reactivos que producían interferencias en los ensayos. Sin embargo, en términos generales una energía de activación de 5,5 kcal/mol es baja al compararla con las descritas en publicaciones sobre esta materia. Sería interesante realizar estudios comparativos entre la lipasa quimérica y lipasas mesófilas de origen bacteriano, con el fin de llevar a cabo análisis comparativos a nivel de secuencia.

Al tratar de separar la lipasa de la MBP mediante digestión con enteroquinasa, la lipasa quimérica se degradó y no fue posible obtenerla de forma activa. Probablemente

porque la MBP estabiliza a la lipasa o la protege de la degradación de proteasas presentes en solución. Sin embargo tener la lipasa activa unida a MBP puede ser una ventaja desde el punto de vista de su utilización a nivel industrial, mediante su inmovilización en soportes sólidos. Una forma es aprovechar la capacidad de la MBP de unirse a la maltosa y así inmovilizar la proteína de fusión en una columna con resina de amilosa con el fin de poder reutilizar la enzima.

Finalmente, cabe destacar que el uso de la ingeniería en proteínas puede ser una útil herramienta para aumentar la actividad específica de la lipasa aislada y hacerla menos inestable manteniendo su actividad a bajas temperaturas.

## 5. CONCLUSIONES

---

Mediante el diseño y uso de partidores específicos para amplificar lipasas de origen bacteriano del grupo IV, se logró amplificar un fragmento parcialmente codificante para lipasa a partir de una bacteria de origen marino Antártico.

Como un *Psychrobacter sp.* fue identificada la especie bacteriana desde la cual se aisló el gen codificante para lipasa, según un análisis filogenético.

Se logró obtener la secuencia completa de un nuevo gen codificante para lipasa utilizando un método de *genome walking* estandarizado en el laboratorio, mostrando ser una técnica rápida y eficiente. Esta técnica permitió obtener las secuencias río arriba y río abajo del gen codificante para lipasa a partir de un fragmento de secuencia conocida, incluyendo la región promotora.

El análisis de la secuencia de la lipasa aislada reveló la presencia de regiones altamente conservadas en lipasas activas a bajas temperaturas pertenecientes al grupo IV de lipasas bacterianas.

La expresión del gen codificante para lipasa en forma recombinante fue posible en *E. coli*.

La lipasa se obtuvo de forma activa cuando se encontraba unida a la MBP como una lipasa quimérica. Esta fue caracterizada según sus propiedades de actividad lipolítica encontrándose una alta actividad para la hidrólisis de *p*-NPP a bajas temperaturas.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

Abdou AM. 2003. Purification and partial characterization of psychrotrophic *Serratia marcescens* lipase. J. Dairy Sci. 86:127-132.

Alquati C, De Gioia L, Santarossa G, Alberghina L, Fantucci P, Loti M. 2002. The cold-active lipase of *Pseudomonas fragi*: heterologous expression, biochemical characterization and molecular modeling. Eur. J. Biochem. 269:3321-3328.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Armstrong N, de Lencastre A, Gouaux E. 1999. A new protein folding screen: Application to the ligand binding domains of a glutamate and kainate receptor and to lysozyme and carbonic anhydrase. Protein Sci. 8:1475-83.

Arpigny JL, Jaeger KE. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. Biochem. J. 343:177-183.

Baneyx F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Curr. Opin. Biotechnol. 10:411-421.

Berchet V, Boulanger D, Gounot AM. 2000. Use of gel electrophoresis for the study of enzymatic activities of cold-adapted bacteria. J Microbiol. Methods 40:105-10.

Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. 1996. Protein methods. Editorial Wiley-Liss, segunda edición.

Bouriotis V, Tsigos I. 2002. Enzymatic catalysis at low temperature-Exploring the potential of cold adapted enzymes in biotechnology. Business briefing: Life sciences technology.

Brahimi-Horn MC, Guglielmino ML, Gaal AM, Sparrow LG. 1991. Nondenaturing protein electrotransfer of the esterase activity of lipolytic preparations. Anal. Biochem. 196:76-79.

Cavicchioli R, Siddiqui KS, Andrews D, Sowers KR. 2002. Low-temperature extremophiles and their applications. Curr. Opin. Biotechnol. 13:253-261.

Chen H, Bjercknes M, Kumar R, Jay E. 1994. Determination of the optimal aligned spacing between the Shine-Dalgarno sequence and the translation initiation codon of *Escherichia coli* mRNAs. Nucleic Acids Res. 22:4953-7.

- Choo DW, Kurihara T, Suzuki T, Soda K, Esaki N. 1998. A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas sp.* strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:486-491.
- Copeland A, Lucas S, Lapidus A, Barry K, Detter C, Glavina T, Hammon N, Israni S, Pitluck S, Richardson P. Unpublished. Sequencing of the draft genome and assembly of *Psychrobacter cryohalolentis* K5.
- Cygler M, Schrag J.D, Sussman JL, Harel M, Silman I, Gentry MK, Doctor BP. 1993. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Sci.* 2:366-382.
- Dale JW. 1998. *Molecular genetics of bacteria.* John Wiley & Sons.
- Duilio A, Madonna S, Tutino ML, Pirozzi M, Sannia G, Marino G. 2004. Promoters from a cold-adapted bacterium: definition of a consensus motif and molecular characterization of UP regulative elements. *Extremophiles* 8:125-32.
- Feller G, Thiry M, Arpigny JL, Gerday C. 1991. Cloning and expression in *Escherichia coli* of three lipase-encoding genes from the psychrotrophic antarctic strain *Moraxella TA144*. *Gene* 102:111-115.
- Feller G, Thiry M, Gerday C. 1991. Nucleotide sequence of the lipase gene lip2 from the antarctic psychrotroph *Moraxella TA144* and site-specific mutagenesis of the conserved serine and histidine residues. *DNA Cell. Biol.* 10:381-388.
- Feller G, Narinx E, Arpigny JL, Aittaleb M, Baise E, Genicot S, Gerday C. 1996. Enzymes from psychrophilic organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 18:189-202.
- Feller G, Gerday C. 1997. Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cell. Mol. Life Sci.* 53:830-841.
- Fischer M, Pleiss J. 2003. The lipase engineering database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucleic Acids Res.* 31:319-321.
- Georlette D, Blaise V, Collins T, D'Amico S, Gratia E, Hoyoux A, Marx JC, Sonan G, Feller G, Gerday C. 2004. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiol. Rev.* 28:25-42.
- Gerday C, Aittaleb M, Arpigny JL, Baise E, Chessa JP, Garsoux G, Petrescu I, Feller G 1997. Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochim. Biophys. Acta.* 1342:119-31.
- Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, Chessa, JP, Claverie P, Collins T, D'Amico S, Dumont J, Garsoux G, Georlette D, Hoyoux A, Lonhienne T, Meuwis MA., Feller G

2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol.* 18:103-107.
- Gianese G, Argos P, Pascarella S. 2001. Structural adaptation of enzymes to low temperatures. *Protein Eng.* 14:141-148.
- Gomes J, Steiner W. 2004. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technol. Biotechnol.* 42:223-235.
- Gupta R, Gupta N, Rathi P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:763-781.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Harley C, Reynolds R. 1987. Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic acids Res.* 15:2343-61.
- Huston AL, Krieger-Brockett BB, Deming JW. 2000. Remarkably low temperature optima for extracellular enzyme activity from Arctic bacteria and sea ice. *Environ. Microbiol.* 2:383-8.
- Hou WC, Chen HJ, Chang CF, Lin YH. 1999. Purification and properties of fatty acid esterases from yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40:305-310.
- Hoyoux A, Blaise V, Collins T, D'Amico S, Gratia E, Huston AL, Marx JC, Sonan G, Zeng Y, Feller G, Gerday C. 2004. Extreme catalysts from low-temperature environments. *J. Biosci. Bioeng.* 98:317-30.
- Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, van Heuvel M., Misset O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* 15:29-63.
- Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases" *Annu. Rev. Microbiol.* 53:315-351.
- Jaeger KE, Eggert T. 2002. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:390-397.
- Jiang Z, Zheng Y, Luo Y, Wang G, Wang H, Ma Y, Wei D. 2005. Cloning and expression of a novel lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* B52. *Mol. Biotechnol.* 2:95-101.
- Jung YJ, Oh TK, Kim HK. Unpublished. Cloning of lipase gene from *Bacillus megaterium*.



- Kanaya S, Koyanagi T, Nanaya E. 1998. An esterase from *Escherichia coli* with a sequence similarity to hormone-sensitive lipase. *Biochem. J.* 332:75-80.
- Kapust RB, Waugh DS. 1991. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* 8:1668–1674.
- Kilstrup M, Kristiansen KN. 2000. Rapid genome walking: a simplified oligo-cassette mediated polymerase chain reaction using a single genome-specific primer. *Nucleic Acids Res.* 28:E55.
- Kim HK, Jung YJ, Oh TK. Unpublished. Cloning of lipase gene from *Bacillus megaterium*.
- Kirk O, Christensen MW. 2002. Lipases from *Candida antarctica*: unique biocatalysts from a unique origin. *Org. Process Res. Dev.* 6:446-451.
- Kouker G, Jaeger KE. 1986. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 211-213.
- Kulakova L, Galkin A, Kurihara T, Yoshimura T, Esaki N. Unpublished. Cold-active lipase from psychrophilic bacteria *Psychrobacter sp.* St1: gene cloning and protein characterization.
- Kulakova L, Galkin A., Nakayama T, Nishino T, Esaki, N. 2004. Cold-active esterase from *Psychrobacter sp.* Ant300: gene cloning, characterization, and the effects of Gly->Pro substitution near the active site on its catalytic activity and stability. *Biochim. Biophys. Acta* 1696:59-65.
- Lee SW, Won K, Lim HK, Kim JC, Choi GJ, Cho KY. 2004. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65:720-726.
- Maia MMD, Heasley A, Camargo de Morais MM, Melo EHM, Morais Jr MA, Ledingham, W.M., J.L. Filho, L. 2001. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation”. *Bioresour. Technol.* 76:23-27.
- Marshall CJ. 1997. Cold-Adapted enzymes. *Trends Biotechnol.* 15:359-364.
- Mattsson P, Tenhunen T. 2003. Purification of His-tagged proteins from inclusion bodies using QuickPick™ IMAC. Nota técnica, protein chemistry.

Mizuguchi S, Amada K, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M, Kanaya S. 1999. Identification of the gene encoding esterase, a homolog of hormone-sensitive Lipase, from an oil-degrading bacterium, HD-1. *J. Biochem.* 126:731-7.

Nthangeni MB, Ramagoma F, Tlou MG, Litthauer D. 2004. Development of a versatile cassette for directional genome walking using cassette ligation-mediated PCR and its application in the cloning of complete lipolytic genes from *Bacillus* species. *J. Microbiol. Methods* 61:225-34.

Page RDM. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12:357-358.

Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29:119-131.

Pleiss J, Fischer M, Schmid RD. 1998. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chem. Phys. Lipids* 93:67-80.

Pleiss J, Fischer M, Peiker M, Thiele C, Schmid RD. 2000. Lipase engineering database. Understanding and exploiting sequence-structure-function relationships. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 10:491-508.

Quyen DT, Schmidt-Dannert C, Schmid RD. 1999. High-level formation of active *Pseudomonas cepacia* lipase after heterologous expression of the encoding gene and its modified chaperone in *Escherichia coli* and rapid in vitro refolding. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:787-94.

Rashid N, Shimada Y, Ezaki S, Atomi H, Imanaka T. 2001. Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas sp.* strain KB700A. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4064-4069.

Riley J, Butler R, Ogilvie D, Finniear R, Jenner D, Powell S, Anand R, Smith JC, Markham AF. 1990. A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones. *Nucleic Acids Res.* 18:2887-90.

Rishi AS, Nelson ND, Goyal A, 2004. Genome walking of large fragments: an improved method. *J. Biotechnol.* 111:9-15.

Rudolph R, Lilie H. 1996. In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* 10:49-56.

Ryu HS, Kim HK, Choi WC, Kim MH, Park SY, Han NS, Oh TK, Lee JK. 2005. New cold-adapted lipase from *Photobacterium lipolyticum sp. nov.* that is closely related to filamentous fungal lipases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9:1-6.

- Sachdev D, Chirgwin, JM. 1998. Order of fusions between bacterial and mammalian proteins can determine solubility in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244: 933-7.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press. Second edition.
- Sellek GA, Chaudhuri JB. 1999. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzym. Microb. Tech.* 25:471-482.
- Sheridan PP, Panasik N, Coombs JM., Brenchley JE. 2000. Approaches for deciphering the structural basis of low temperature enzyme activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1543:417-433.
- Sivaraman K, Seshasayee AS, Swaminathan K, Muthukumaran G, Pennathur G. 2005. Promoter addresses: revelations from oligonucleotide profiling applied to the *Escherichia coli* genome. *Theor. Biol. Med. Model.* 2:20.
- Sprengart ML, Fuchs E, Porter AG. 1996. The downstream box: an efficient and independent translation initiation signal in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 15:665-74.
- Suzuki T, Nakayama T, Choo DW, Hirano Y, Kurihara T, Nishino T, Esaki N. 2003. Cloning, heterologous expression, renaturation, and characterization of a coldadapted esterase with unique primary structure from a psychrotroph *Pseudomonas sp.* strain B11-1. *Protein Expr. Purif.* 30:171-178.
- Suzuki T, Nakayama T, Kurihara T, Nishino T, Esaki N. 2001. Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter sp.* strain no. 6. *J. Biosci. Bioeng.* 92:144- 148.
- Suzuki T, Nakayama T, Kurihara T, Nishino T, Esaki N. 2002. Primary structure and catalytic properties of a cold-active esterase from a psychrotroph, *Acinetobacter sp.* strain no. 6 isolated from Siberian soil. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:1682-1690.
- Triglia T, Peterson MG, Kemp DJA. 1998. Procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.* 16:8186.
- Villeneuve P, Muderhwa JM, Graille J, Haas M. 2000. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J. Molec. Catalysis B: Enzymatic* 9:113-148.

## 7. MATERIAL COMPLEMENTARIO

---

### 7.1 Secuencia nucleotídica del gen codificantes para lipasa aislado a partir de una bacteria de origen marino antártico del género *Psychrobacter*.

ATGCCTATTT	TACCAGTGCC	ATCGCTCAAT	GCTTTATTGA	CAAAAACGCT	50
TAAGACCGTA	AAAAAGACAG	CCGCTAAAAA	TGTGCACCAG	CATCATATTT	100
TGCACCATAC	GCTAAAAGGG	TTGGATAATC	TGCCAACGCC	GCTACTCGAA	150
CGAGTTAATC	ACCAATTAAA	AGCGTCTACA	GCGGAGCAAT	ATCCCCTTGC	200
TGACGCCCAT	CTGCGCCTGA	TACTTGCGGT	CAGTAATAAG	CTCAAGCGCC	250
CGTTAGCACT	GGATAAGCTA	CCCAACCTAC	GGCAGAAATT	TGGTACAGAT	300
GCGGTGTCGT	TGCAAGCACC	TAGCGTTTGG	CAACAAAATG	CTGAGGCCTC	350
AGGAAATTCA	GAGAATGCCG	TCAGCTGGCA	AGATAAGACC	ATTGCCAATG	400
CGGATGGTGG	TGATATGACC	GTGCGCTGCT	ACCAGCAGTC	GAAGCAGAAT	450
AACGAGGGAA	AAAGTACGGA	TGAAGTCGCC	ATGCTGTTTT	TTCATGGGGG	500
CGGGTTTTGT	ATTGGCGATA	TCGACACGCA	TCATGAGTTT	TGTCATACGG	550
TCTGTGCCCA	AACTGGCTGG	GCAGTCGTGA	GTGTCGACTA	TCGCATGGCT	600
CCTGAATATC	CAGCGCCAAC	AGCTCTTAAA	GACTGTCTGT	CGGCTTACGC	650
TTGGCTGACT	GAACATTCTC	AGTCACTTGG	TGCATTGCCA	TCGCGCATCG	700
TATTGTCTGG	TGATAGTGCA	GGTGGTTGCT	TGGCAGCACT	GGTGGCGCAG	750
CAGTTTATCA	AGCCTATCGA	TGCATTATGG	CAAGATAATA	ATCAAGCTAC	800
TGAGACTGAT	AAAAAAGCCA	ATGACACCTT	TAAAAAATCA	CTGGCTGATT	850
TGCCGCGACC	TTTAGCACAA	TTGCCGCTCT	ACCCTGTCAC	TGATTATGAG	900
GCTGAATATC	CAAGTTGGGA	GCTTTATGGT	GAAGGCTTGC	TGCTCGATCA	950
CAACGATGCA	AATGTCTTTA	ATACTGCCTA	CACTCAGCAC	AGTGGTCTAA	1000
TGCAGTCCCA	CCCGCTTATC	TCAGTCATGC	ACGGTGACAA	TGCGCACCTG	1050
TGTCCAAGCT	ATGTCGTCGT	TGCGGAATTA	GATATCTTGC	GAGATGAAGG	1100
ACTGGCTTAT	GCCGAGCTTT	TGCAAAAAGA	AGGCGTTAAG	GTAGAAACTT	1150
ATACAGTGCT	AGGCGCACCG	CATGGTTTTA	TTAACTTGAT	GAGTGTCCAT	1200
CAAGGTCTTG	GCAATCAGAC	AAACTATATT	ATCAAGTCGT	TTGCTTGTTC	1250
TGTGCAAAAC	CTACTGACCA	GTGAGGGTGA	TGAGCCAAAT	CTC	1300

## 7.2 Secuencia río arriba del gen codificante para lipasa.

GGCTTTAAAA	GTGTCAAGAT	TGATGTCATT	TTCGATCGTC	ATCTCTTCAC	50
CTGAGTTATT	CTGTGGATCA	AACTCTTTCA	AGGTTTCTTC	TAAAATGCTC	100
TCATCGTGGT	CAATATTGTC	ATGTGACACA	TTTTGCTCAA	GAGATTCTTG	150
GTTTCGTATTC	TGCTCGCTCA	TGGTAGCTCC	TTAGGATTAT	TAATATAATG	200
GTTGGTTTTA	AGGCACAACA	AACCGACCAA	GGGCTGATCA	TTGTGCTTTT	250
ATTAATGGCC	TAACTGTTTT	TGTTCACTCT	TTTTTAAATG	CGCTTCAATA	300
GCTGCTTGAT	AAAGGTGATG	ACCATAAATT	TCAAGCCTAA	TATGAGGAAT	350
TTTTTCGCTTT	AGCCAGATAA	ATCATTGCAG	AGCATAAGGA	TTATTGTCAA	400
TAACGCAATA	AATGCTGCGA	TAAATAACGG	GGAGACATGA	TTATATTTTT	450
GTCATCGAGC	CATGCTTAGC	TTTATGGTGA	CGAGCTTTTA	AGATAGATTT	500
GAATTTAGTA	TAAATCTTAT	GATTAAGTGC	TATATTAATC	GTTCACTTAT	550
AAAGCCGACT	AATTTTGTTT	AAACATCGAT	TACAAGAGAG	GGTTTATG*	600

\*El codón de inicio del gen de lipasa se destaca en amarillo.

**7.3 Secuencia nucleotídica parcial del RNA ribosomal 16S de la cepa 2-17, aislado de origen marino Antártico.**

GAGAGGATGA	TCAGCCACAC	CGGGACTGAG	ACACGGCCCG	GACTCCTACG	50
GGAGGCAGCA	GTGGGGAATA	TTGGACAATG	GGGGAAACCC	TGATCCAGCC	100
ATGCCGCGTG	TGTGAAGAAG	GCCTTTTGGC	TGTAAAGCAC	TTTAAGCAGT	150
GAAGAAGACT	CCGTGGTTAA	TACCCACGGA	CGATGACATT	AGCTGCAGAA	200
TAAGCACCGG	CTAACTCTGT	GCCAGCAGCC	GCGGTAATAC	AGAGGGTGCA	250
AGCGTTAATC	GGAATTACTG	GGCGTAAAGG	GAGCGTAGGT	GGCTCGATAA	300
GTCAGATGTG	AAATCCCCGG	GCTCAACCTG	GGAACTGCAT	CTGATACTGT	350
TGAGCTAGAG	TATGTGAGAG	GAAGGTAGAA	TTCCAGGTGT	AGCGGTGAAA	400
TGCGTAGAGA	TCTGGAGGAA	TACCGATGGC	GAAGGCAGCC	TTCTGGCATA	450
ATACTGACAC	TGAGGCTCGA	AAGCGTGGGT	AGCAAACAGG	ATTAGATACC	500
CTGGTAGTCC	ACGCCGTAAA	CGATGTCTAC	TAGTCGTTGG	GTCCCTTGAG	550
GACTTAGTGA	CGCAGCTAAC	GCAATAAGTA	GACCGCCTGG	GGAGTACGGC	600
CGCAAGGTTA	AAACTCAAAT	GAATTGACGG	GGGCCCGCAC	AAGCGGTGGA	650
GCATGTGGTT	TAATTCGATG	CAACGCGAAG	AACCTTACCT	GGTCTTGACA	700
TATCTAGAAT	CCTGCAGAGA	TGCGGGAGTG	CCTTCGGGAA	TTAGAATACA	750
GGTGCTGCAT	GGCTGTTCGTC	AGCTCGTGTC	GTGAGATGTT	GGGTAAAGTC	800
CCGCAACGAG	CGCAACCCTT	GTCCTTAGTT	ACCAGCGGGT	TAAGCCGGGG	850
ACTCTAAGGA	TACTGCCAGT	GACAAACTGG	AGGAAGGCGG	GGACGACGTC	900
AAGTCATCAT	GGCCCTTACG	ACCAGGGCTA	CACACGTGCT	ACAATGGTAG	950
GTACAGAGGG	CAGCTACACA	GCGATGTGAT	GCGAATCTCA	AAAAGCCTAT	1000
CGTAGTCCAG	ATTGGAGTCT	GCAACTCGAC	TCCATGAAGT	AGGAATCGCT	1050
AGTAATCGCG	GAATCACTAG	TGAATTCGCG	GCCGCCTGCA	GGTCGACCAT	1100
ATGGGAGAGC	TCCAACGCG	TTGGATGCAT	AGCTTGAGTA	TT	1150

### 7.3 Alineamiento mediante Blastp de la lipasa obtenida de la cepa 2-17 con lipasa 2 de Moraxella sp.

```

> gi|296842|emb|CAA37862.1 triacylglycerol lipase [Moraxella sp.]
gi|126302|sp|P24484|LIP2\_MORS1 Lipase 2 (Triacylglycerol lipase)
Length=433

Score = 769 bits (1986), Expect = 0.0
Identities = 387/431 (89%), Positives = 407/431 (94%), Gaps = 0/431 (0%)

Query 1 MPILPVPSlnalltktlktvkkttaaknvHQHHILHHTLKGLDNLPTPLLERVNHQLKAST 60
Sbjct 1 MPILPVP+LNALLTKT+KT+K AAKN HQHH+LHHTLKGLDNL P+LER+N +LKAST
MPILPVPALNALLTKTIKTIKTGAAKNAHQHHVLHHTLKGLDNL PAVLERINRRLKAST 60

Query 61 AEQYPLADAHRLRLILAVSNKLRPLALDKLPNLRQKFGTDAVSLQAPSVWQONAEASGNS 120
Sbjct 61 AEQYPLADAHRLRLILA+SNKLRPLA+DKLP LRQKFGTDAVSLQAPSVWQONA+ASG++
AEQYPLADAHRLRLILAISNKLKRPLAIDKLPKLRQKFGTDAVSLQAPSVWQONADASGST 120

Query 121 ENAVSWQDKTIANADGGDMTVRCYQSQKQNNNEGKSTDEVAMLFFHGGGFCIGDIDTHHEF 180
Sbjct 121 ENAVSWQDKTIANADGGDMTVRCYQ+S QN+E KSTDE AMLFFHGGGFCIGDIDTHHEF
ENAVSWQDKTIANADGGDMTVRCYQKSTQNSERKSTDEAAMLFFHGGGFCIGDIDTHHEF 180

Query 181 CHTVCAQTGWAVVSVDYRMAPEYPAPTALKDCLSAAYAWL TEHSQSLGALPSRIVLSGDSA 240
Sbjct 181 CHTVCAQTGWAVVSVDYRMAPEYPAPTALKDCL+AYAWL EHSQSLGA PSRIVLSGDSA
CHTVCAQTGWAVVSVDYRMAPEYPAPTALKDCLAAYAWLAEHSQSLGASPSRIVLSGDSA 240

Query 241 GGCLAALVAQQVIKPIDALWQDNNQATETDKKANDTFKSLADLPRPLAQLPLYPVTDYE 300
Sbjct 241 GGCLAALVAQQVIKPIDALWQDNNQA DKK NDTFK SLADLPRPLAQLPLYPVTDYE
GGCLAALVAQQVIKPIDALWQDNNQAPAADKKVNDTFKNSLADLPRPLAQLPLYPVTDYE 300

Query 301 AEYPSWELYGEGLLLDHNDANVFNTAYTQHSGLMQSHPLISVMHGDNAHLCP SYVVVAEL 360
Sbjct 301 AEYPSWELYGEGLLLDHND A VFN+AYTQHSGL QSHPLISVMHGDN LCPSY+VVAEL
AEYPSWELYGEGLLLDHNDAEVFNSAYTQHSGLPQSHPLISVMHGDNTQLCP SYIVVAEL 360

Query 361 DILRDEGLAYAELLQKEGVKQVETTYTVLGAPHGFINLMSVHQGLGNQTYIIKSFACFVQN 420
Sbjct 361 DILRDEGLAYAELLQKEGV+V+TYTVLGAPHGFINLMSVHQGLGNQTYII FAC VQN
DILRDEGLAYAELLQKEGVQVQTYTVLGAPHGFINLMSVHQGLGNQTYIINEFACLVQN 420

Query 421 LLTSEGDEPNL 431
LLTSEG+PNL

```