



UNIVERSIDAD DE CHILE- FACULTAD DE CIENCIAS- ESCUELA DE  
PREGRADO

“BÚSQUEDA BIOINFORMÁTICA Y ESTUDIO DE UNA LIPASA  
PROVENIENTE DE *STREPTOMYCES LEEUWENHOEKII* C34<sup>T</sup>”

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

**SEBASTIÁN JESUS AMADEO RODRÍGUEZ VEGA**

DIRECTOR DEL SEMINARIO: JUAN ASENJO DE LEUZE

PROFESOR PATROCINANTE: CARLOS JEREZ GUEVARA

Agosto 2018

Santiago – Chile



UNIVERSIDAD DE CHILE- FACULTAD DE CIENCIAS- ESCUELA DE  
PREGRADO

### INFORME DE APROBACIÓN DE SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el seminario de Título, presentado por la **Sr. Sebastián Rodríguez Vega**

**“Búsqueda bioinformática y estudio de una lipasa proveniente de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34<sup>T</sup>”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dr. Juan Asenjo De Leuze \_\_\_\_\_  
Director del seminario de título

#### Comisión de evaluación

Dra. Inmaculada Vaca Cerezo \_\_\_\_\_  
Presiden de la comisión

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman \_\_\_\_\_  
Evaluador

Santiago de Chile, junio 2018

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>Índice de contenidos</b> .....	<b>ii</b>
<b>Índice de tablas</b> .....	<b>iii</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>iv</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>v</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>ix</b>
<b>Capítulo 1: Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1 Importancia biotecnológica de las enzimas .....	1
1.2 Las enzimas lipasas .....	2
1.3 Enzimas de ambientes extremos .....	4
1.4 El Desierto de Atacama.....	6
1.5 <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C34 .....	8
<b>Capítulo 2: Objetivos</b> .....	<b>10</b>
2.1 Objetivo general .....	10
2.2 Objetivos específicos .....	10
<b>Capítulo 3: Materiales y Métodos</b> .....	<b>11</b>
3.1 Reactivos empleados .....	11
3.2 Cepas y cultivos bacterianos .....	11
3.3 Búsqueda bioinformática de lipasas extracelulares .....	12
3.4 Generación del plásmido LIP .....	12
3.5 Generación del plásmido LIPCOL .....	13
3.6 Transformación de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 y generación de la cepa LIP .....	13

3.7 Transformación de <i>E. coli</i> Rosetta2 y generación de la cepa LIPCO .....	14
3.8 Expresión de la proteína SLE_62990 en <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 .....	14
3.9 Expresión heteróloga del gen <i>sle_62990</i> en <i>E.coli</i> Rosetta 2 .....	15
3.10 Ensayo de actividad lipasa .....	15
3.11 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	16
<b>Capítulo 4: Resultados .....</b>	<b>17</b>
4.1 Búsqueda bioinformática de lipasas extracelulares en el genoma de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34.....	17
4.2 Generación del plásmido LIP .....	20
4.3 Generación del plásmido LIPCOL .....	23
4.4 Transformación de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 con el plásmido LIP.....	26
4.5 Evaluación de la sobre-expresión de la proteína SLE_62990 en <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C34 LIP.....	27
4.6 Evaluación de la expresión heteróloga de la proteína SLE_62990 en <i>E. coli</i> Rosetta 2.....	30
<b>Discusión .....</b>	<b>33</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>38</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>39</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Capítulo 4:</b> .....	<b>17</b>
<b>Tabla 1:</b> Genes de posibles lipasas extracelulares encontrados en el genoma de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34.....	<b>18</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Capítulo 4</b> .....	<b>17</b>
<b>Figura 1:</b> Output del programa SignalP-4.1 utilizando la secuencia aminocídica del gen <i>sle_62990</i> .....	18
<b>Figura 2:</b> Representación gráfica de los fragmentos LIP y LIPCOL obtenidos mediante PCR.....	19
<b>Figura 3:</b> Electroforesis en gel de agarosa al producto PCR que contiene el amplificado LIP.....	20
<b>Figura 4:</b> Esquema del plásmido LIP .....	21
<b>Figura 5:</b> Electroforesis en gel de agarosa al producto de PCR de colonia realizado a los transformantes DH5 $\alpha$ LIP .....	21
<b>Figura 6:</b> Electroforesis en gel de agarosa al producto de doble digestión realizado a los plásmidos extraídos de las colonias positivas .....	23
<b>Figura 7:</b> Esquema del plásmido LIPCOL .....	24
<b>Figura 8:</b> Electroforesis en gel de agarosa al producto PCR de colonia realizado a los transformantes DH5 $\alpha$ LIPCOL .....	25
<b>Figura 9:</b> Electroforesis en gel de agarosa al producto de doble digestión realizados a los plásmidos LIPCOL 2, 6 y 7. ....	26
<b>Figura 10:</b> Electroforesis en gel de agarosa al producto de PCR realizado al stock de esporas de la cepa LIP .....	27
<b>Figura 11:</b> Resultados obtenidos del ensayo de actividad lipasa realizado con las distintas fracciones de cultivo .....	28
<b>Figura 12:</b> Resultados de los ensayos de actividad lipasa realizados a distintas temperaturas de incubación .....	29
<b>Figura 13:</b> Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con tinción de plata a muestras concentradas de sobrenadantes de la cepa LIP y WT .....	30

<b>Figura 14:</b> Resultados del ensayo de actividad de las diferentes fracciones de cultivo obtenidas de la inducción con 0.05 y 0.1 mM IPTG.....	31
<b>Figura 15:</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida a muestras obtenidas de las distintas inducciones. ....	32

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido deoxirribonucleico
BLAST	Basic local alignment search tool
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-tiogalactósido
kDa	Kilodalton
LB	Medio Luria Bertani
TB	Medio Terrific Broth
M	Molar
nm	nanómetros
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
UFC	Unidades formadoras de colonias
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

## RESUMEN:

Actualmente, el uso de enzimas corresponde a un área de la biotecnología de gran crecimiento y desarrollo, la cual ha buscado dar solución a problemas de tipo industriales, biomédicos y domésticos; representando una solución específica, sustentable y ecológicamente amigable. En el ámbito de la innovación, como parte de una mejora tecnológica se ha buscado obtener enzimas estables y que puedan ser utilizadas en condiciones extremas de pH, temperatura, salinidad etc. Los microorganismos provenientes de ambientes extremos representan una buena fuente de este tipo de enzimas, ya que generalmente estos microorganismos precisan de este tipo de enzimas para la sobrevivencia en las condiciones hostiles de su hábitat.

Un ambiente extremo que ha sido poco explorado en este sentido es el Desierto de Atacama. Conocido por ser el desierto más antiguo y árido del planeta, presenta condiciones ambientales que hacen que sea considerado como un ambiente extremo único en el mundo. Pese a estas condiciones adversas, diversos microorganismos han podido ser aislados desde este ambiente tan particular. Entre ellos esta *Streptomyces leeuwenhoekii* C34 que presenta varios grados de tolerancia a condiciones extremas.

En este trabajo se realizó la búsqueda bioinformática de enzimas de interés comercial en el genoma de *S. leeuwenhoekii* C34. Teniendo en cuenta el gran potencial biotecnológico y diversidad de aplicaciones de las enzimas lipasas, se seleccionó el gen *sle\_62990* que codifica para una lipasa putativa GDSSL- SGNH. Con el fin de estudiar este gen se generó la cepa LIP de *S. leeuwenhoekii* C34 que sobre expresa el gen *sle\_62990*. Con esta cepa se pudo comprobar que el gen *sle\_62990* codifica para una lipasa extracelular funcional y que presenta actividad contra *p*-nitrofenil palmitato. También se intentó la expresión heteróloga de la enzima en el medio intracelular de *E. coli*. Sin embargo, no se obtuvieron los resultados esperados, ya que se encontró en cuerpos de inclusión.

## ABSTRACT:

Currently, the use of enzymes corresponds to a growing area in the biotechnology field which has sought to solve industrial, biomedical, and domestic problems. These represent a specific, sustainable and ecologically friendly solution. Stable enzymes that can be used under extreme conditions such as high pH, temperature and salinity are of particular interest for biotechnological improvement. Microorganisms from extreme environments require these types of enzymes in order to survive under the harsh conditions of their habitat. Therefore, they represent a good source of interesting enzymes. An extreme environment that has been little explored is the Atacama Desert. The Atacama Desert is known as the oldest and driest desert on Earth. It presents extreme environmental conditions. Despite these harsh conditions, various microorganisms have been isolated from this particular environment. Among them *Streptomyces leeuwenhoekii* C34, that shows several degrees of tolerance to extreme conditions. In this work, possible commercial enzymes were searched in the genome of *S. leeuwenhoekii* C34. Considering the great biotechnological potential and the diversity of applications of the lipases enzymes the gene *sle\_62990* that encoded for a putative lipase was selected. In order to study this gene, the LIP strain of *S. leeuwenhoekii* C34 that over-expressed the *sle\_62990* was generated. The over-expression allowed to confirm that the *sle\_62990* gene encodes for a functional extracellular lipase and it has activity against *p*-nitrophenyl palmitate. Attempts to heterologously express this gene in *E. coli* were unsuccessful.

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1 Importancia biotecnológica de las enzimas.

Las enzimas son biocatalizadores naturales y cumplen un rol crucial catalizando reacciones de vital importancia para el metabolismo y mantenimiento de la homeostasis en los seres vivos (Gurung et al., 2013). El término “enzima” fue aplicado por primera vez en 1877 por Wilhelm Friedrich Kuhne (Kühne, 1976). Sin embargo, la capacidad para catalizar reacciones de las enzimas ha sido utilizada por la humanidad durante miles de años atrás, principalmente mediante el uso de microorganismos productores de enzimas para la fermentación de brebajes como el vino, la cerveza y el vinagre, así como también en la producción de alimentos como el pan y productos derivados de la leche (Gurung et al., 2013).

Los avances en las ciencias han permitido la generación de un amplio conocimiento de los distintos tipos de enzimas, su estructura y mecanismo de acción (Gurung et al., 2013). Por su parte, la biotecnología ha logrado utilizar este conocimiento y avanzar en la aplicación del uso de enzimas como parte de una mejora tecnológica en algunos procesos industriales, biomédicos y domésticos. Específicamente, el uso de enzimas juega un rol clave en la producción de alimentos y bebidas, productos de limpieza, ropa, papel, fármacos, dispositivos de diagnósticos, entre otros. (Adrio & Demain, 2014). Comúnmente, la mayoría de las enzimas usadas industrialmente son del tipo hidrolasas y son utilizadas principalmente para la degradación de varias sustancias naturales (Adrio & Demain, 2014). Las enzimas provenientes de microorganismos han demostrado ser de más utilidad que las provenientes de plantas o animales, debido a la gran variedad de actividades catalíticas disponibles, los altos rendimientos posibles en su producción y la fácil manipulación genética (Wiseman, 1995).

Existen diversos beneficios que hacen al uso de enzimas preferibles frente a otras alternativas, como por ejemplo, la reducción de energía de activación, la especificidad por el sustrato y el reducimiento de los costos en el tratamientos de los desechos (Hasan et al., 2006). Por otra parte, el incremento de las legislaciones que tienen por objetivo la protección del medio ambiente ha forzado al rubro industrial a buscar nuevas metodologías que sean más sustentables. Todo esto se ha traducido en la inserción de las enzimas en varios procesos industriales, ya que han demostrado ser una solución eficiente y sustentable para problemáticas de diversas índoles (Adrio & Demain, 2014).

El mercado de enzimas es muy variado debido a la diversidad de enzimas y sus posibles aplicaciones. Durante el año 2014 el mercado global de enzimas fue estimado en 4,2 billones de dólares y se pronostica un tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) de un 7% entre el 2015 y 2020 (Singh et al., 2016). Las proteasas ocupan el primer lugar de ventas debido al uso extensivo en la industria de detergentes y en la industria lechera (Sarrouh et al., 2012). Seguidas por las carbohidratasas, utilizadas principalmente en la industria del almidón, industria textil, detergentes y la industria panadera. También, el uso industrial de enzimas lipasa en la industria cosmética, farmacéutica, alimentaria y de detergentes ha tomado gran protagonismo y se espera que, por la versatilidad y potencial biotecnológico de este tipo de enzimas, se ubiquen en el tercer lugar de ventas en el corto plazo, desplazando a las enzimas fitasas (Hasan et al., 2006).

## 1.2 Las enzimas lipasas.

Las enzimas lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas, E.C. 3.1.1.3) representan una familia ubicua que poseen una importancia fisiológica y un gran potencial en aplicaciones industriales. El rol biológico de las lipasas consiste en la hidrólisis de

triacilglicerol en glicerol y ácidos grasos libres (Sharma et al., 2001). A diferencia de las esterasas, las lipasas solo son activadas cuando son absorbidas en la interfase lípido-agua (Jaeger et al., 1994).

Este tipo de enzimas son consideradas biocatalizadores valiosos, ya que generalmente son estables en solventes orgánicos, tienen un amplio rango de especificidad por sustrato y usualmente presentan una alta regio – y/o estereoselectividad en la catálisis (Jaeger et al., 1994). Además, en adición a su función natural de hidrolizar enlaces ésteres carboxílicos, las lipasas pueden catalizar esterificaciones, interesterificaciones y transesterificaciones en medios no acuosos. La versatilidad de reacciones que pueden catalizar hace que tengan una potencial aplicación en la industria de alimentos, química, textil, cosmética, farmacéutica y en la industria del papel (Singh et al., 2016).

Algunos ejemplos referentes al uso concreto de lipasas en la industria son:

- Uso de lipasas en detergentes: la capacidad de hidrolizar lípidos es utilizada en la formulación de los productos provenientes de la industria de detergentes. La hidrólisis de las grasas y/o aceites por parte de las lipasas facilita la disolución de manchas, mejorando la eficacia de los productos de limpieza (Nagayama et al., 1989)
- Uso de lipasas en la industria farmacéutica: Existen varias características de las lipasas que son de gran interés para la industria farmacéutica y también para la industria de agroquímicos. Las lipasas que presentan regio- y estereo-selectividad pueden ser utilizadas para la resolución de muestras racémicas (Kirchner, 1985). También, la capacidad que tienen algunas lipasas de catalizar reacciones en medios no acuosos o con presencia de

solventes orgánicos es de mucha utilidad cuando se utilizan sustratos hidrofóbicos (Hasan et al., 2006). Un ejemplo que denota la gran utilidad de las lipasas en la industria farmacéutica es su uso en la resolución de enantiómeros (*R*, *S*) – del ibuprofeno, mediante la esterificación selectiva en solventes orgánicos (Mustranta. 1992).

- Uso de lipasas en la industria de alimentos: la capacidad de las lipasas para catalizar esterificaciones, interesteificaciones y transterificaciones es de mucha utilidad para la obtención de sustitutos de grasas de alto valor a partir de materias primas de bajo costo. El ejemplo que resalta es la producción de sustitutos de la manteca de cacao a partir de aceites de bajo costo (Hasan et al., 2006). También son utilizadas para mejorar la fragancia y sabor de algunos alimentos (Gandhi, 1997)

### 1.3. Enzimas provenientes de ambientes extremos.

Un problema con el uso enzimático en biotransformaciones industriales es que su actividad y estabilidad está sujeta a las condiciones en las cuales se opera el proceso. Durante un proceso industrial las enzimas son expuestas a un ambiente diferente al de su estado natural, como por ejemplo: pH extremo, altas y bajas temperaturas, presencia de solventes orgánicos, entre otras (Littlechild, 2015). Estas condiciones pueden producir que las enzimas comunes pierdan su actividad o también que se produzcan sub-productos no deseados dentro del proceso, haciendo que el uso de enzimas convencionales no sea una alternativa rentable (Littlechild, 2015).

El descubrimiento de la ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa) en 1976 por Thomas D. Brock, su posterior aplicación en la técnica de PCR y el consecuente impacto de esta técnica en el área de la ciencias biológicas y biotecnología, ha

expuesto el gran beneficio potencial referente al uso de enzimas provenientes de microorganismos extremófilos (Vieille & Zeikus, 2001). Durante las últimas dos décadas, la microbiología de ambientes extremos ha progresado sustancialmente, lo que ha permitido explorar nuevos ambientes extremos y encontrar microorganismos extremotolerantes y extremófilos que aumenta la microdiversidad ya conocida (Horikoshi & Bull, 2011). Esta diversidad de microorganismos que habitan en ambientes extremos de temperatura, presión, pH, y salinidad puede ser explotada para descubrir nuevas enzimas que tengan un mejor rendimiento en aplicaciones o procesos operados en condiciones extremas (Littlechild, 2015).

Actualmente, hay una gran cantidad de microorganismos extremotolerantes con su genoma secuenciado. Además, existen extensas bases de datos de enzimas bien caracterizadas (Van Lanen & Shen, 2006) como, por ejemplo, Uniprot la cual proporciona acceso gratuito a secuencias de proteínas anotadas e información funcional de sus dominios (UniProt Consortium, 2014). Esto hace que la búsqueda bioinformática de enzimas putativas codificadas en los genomas de los microorganismos sea una tarea relativamente fácil, incluso es posible bioprospectar muestras de metagenomas aislados de ambientes extremos, lo cual incluiría la gran diversidad microbiana no cultivable (Steele, 2009).

Las ventajas referentes al uso de enzimas extremófilas y su aplicación dependen de la naturaleza del proceso en el cual se espera operar. Por ejemplo:

- Las enzimas criófilas tienen la ventaja de ser eficientes a bajas temperaturas. La ventaja principal de su uso estaría en el abaratamiento de los costos energéticos de los procesos en los cuales son aplicadas, ya que no se requiere aumentar la temperatura para obtener buenos rendimientos,

pudiendo funcionar a temperatura ambiente o durante la refrigeración de un producto (Feller & Gerday, 2003; Acevedo et al., 2013).

- Las enzimas termófilas tienen la capacidad de operar a altas temperaturas (>50°C). La ventaja de este tipo de enzimas radica en la virtud de operar en procesos realizados a altas temperaturas, ya que aumentan los coeficientes de difusión, aumenta la solubilidad de lípidos y otras moléculas hidrofóbicas, disminuye la viscosidad de los sustratos, aumenta la solubilidad de los reactantes, la velocidad de reacción y se reduce el riesgo de contaminación por microorganismos (Hasan et al., 2006).
- Las enzimas alcalófilas pueden operar y ser eficientes a pH muy altos, lo que permite su uso en procesos y productos que son operados en condiciones alcalinas. Algunos usos que se le dan a este tipo de enzimas son en la industria de detergentes, mediante el uso de proteasas, carbohidratasas y lipasas alcalófilas usados para remover manchas. También son utilizadas en la industria del papel, mediante el uso de xilanansas alcalófilas en el proceso de blanqueamiento de pasta libre de cloro (Horikoshi, 1999).
- Las enzimas halófilas no solo tienen la capacidad de catalizar reacciones en medios con una gran fuerza iónica, sino que también tienen la capacidad de ser funcionales en ambientes donde el agua presenta una baja actividad como solvente (Karan, 2012). Esto permite su uso en medios no acuosos, en presencia de solventes orgánicos y en una alta salinidad, donde la mayoría de las enzimas pierden su estructura y función (Karan, 2012).

#### 1.4 El Desierto de Atacama.

Un ambiente extremo que ha sido poco explorado en la búsqueda de enzimas es el Desierto de Atacama.

El Desierto de Atacama, ubicado en el norte grande de Chile, es el desierto más antiguo y árido de la tierra, el cual ha evolucionado durante millones de años en condiciones de aridez e hiper-aridez (Bull et al., 2016). Este desierto comprende un ambiente que ha sido calificado como el límite de sequedad para la vida (Navarro-González et al., 2003). Las condiciones que hacen al Desierto de Atacama un ambiente extremo son:

- La escasez de agua en estado líquido: la razón anual de la cantidad de lluvia caída y la evaporación da un valor por debajo de 0.05 en las zonas áridas del desierto, mientras que para las zonas hiper-áridas el valor es inferior a 0.002 (Bull et al. 2016).
- Escasez de materia orgánica: la cantidad de carbono orgánico en el suelo es extremadamente baja, entre 2 a 50 µg por gramo de suelo. (Bull et al., 2016).
- Presencia de oxidantes inorgánicos: En los suelos de este desierto hay una prevalencia de sales de halita, nitrato, sulfato y perclorato. Mientras que las salmueras son altas en litio, boro y potasio. Por otra parte, la concentraciones de arsénico en sales y sedimentos son las más altas reportadas en todo el mundo. (Bull et al., 2016).
- Finalmente, presenta los índices más altos de radiación UV registrados en la superficie de la tierra (Cordero et al., 2014), que por sí solo no son una gran limitante para la vida, pero sí lo son cuando actúan en conjunto con la desecación presente en el desierto (Dose et al. 2001).

Pese a estas condiciones extremas, diversos microorganismos han podido ser aislados de diferentes zonas del desierto. Los estudios taxonómicos actuales se han centrado especialmente en dos filos de microorganismos, permitiendo el descubrimiento de nuevas especies (Bull et al., 2016). El primero corresponde a las

cianobacterias, las cuales son conocidas por su capacidad a resistir el estrés ambiental y también por su capacidad de actuar como colonizadores primarios. Por otro lado, el estudio de las Actinobacterias tiene una gran importancia, principalmente por la capacidad que tiene este filo de bacterias para producir compuestos bioactivos de gran relevancia biotecnológica. Entre estas últimas se encuentra la bacteria *Streptomyces leeuwenhoekii* C34.

#### 1.5 *Streptomyces leeuwenhoekii* C34.

*S. leeuwenhoekii* C34 es una bacteria aeróbica gram-positiva perteneciente al filo Actinobacteria. Fue aislada a partir de muestras de suelo obtenidas de una de las zonas hiper-áridas del Desierto de Atacama en Laguna de Chaxa (Okoro et al., 2009). Se ha encontrado que sintetiza nuevos antibióticos como la Chaxamicina y la Chaxalactina (Rateb et al., 2011; Bull & Asenjo, 2013; Castro et al., 2015).

El género *Streptomyces* pertenece a la familia Streptomycetaceae, forman parte de un género ubicuo y son habitantes comunes del suelo. La gran mayoría son saprófitos estrictos, pero también existe evidencia de relaciones patogénicas con plantas (Lerat et al., 2009). En el suelo, juegan un papel de suma importancia en el proceso de mineralización y el reciclamiento del carbono y nitrógeno, ya que generalmente las fuentes de carbono en el suelo se encuentran de forma polimérica e insolubles como la quitina, celulosa, lignocelulosa, pectina, etc. (McCarthy & Williams, 1992). Estos polímeros pueden ser degradados por las enzimas extracelulares producidas por estos microorganismos y de esta forma ser asimilados por la bacteria en su forma más básica (Anné et al., 2014) (Goodfellow & Williams, 1983). Las enzimas extracelulares de este tipo de microorganismos son de gran

interés biotecnológico, ya que estas son expuestas directamente a la adversidad del ambiente y pueden llevar a cabo la catálisis bajo estas condiciones. Así, *S. leeuwenhoekii* C34 presenta varias cualidades que lo hacen buen blanco para estudiar sus enzimas. Como por ejemplo:

- Este microorganismo puede crecer hasta pH 11, a una concentración de 1,7M de sodio y en un rango de temperatura de 4°C a 50°C (Busarakam et al., 2014). Por lo tanto, estaría catalogado como alcalitolerante, halotolerante, psicotolerante y termotolerante (Bowers & Wiegel, 2011).
- El genoma de *S. leeuwenhoekii* C34 ha sido secuenciado combinando las tecnologías de Pacific Bioscience SRMT e Illumina Miseq. La secuencia del genoma es de libre acceso (código de acceso: GCA\_001013905.1) (Gómez-Escribano et al., 2015). Esta disponibilidad de la secuencia del genoma facilita la búsqueda bioinformática de enzimas putativas codificadas en el genoma.
- Mediante un análisis polifásico se demostró que esta cepa es positiva para varias actividades enzimáticas de gran interés biotecnológico como: esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), lipasa (C4), alpha y beta glucosaminidasa. También puede degradar elastina, caseína, celulosa, xilano, almidón, tributirina, tween 40 y tween 30 (Busarakam et al., 2014).

Considerando las características que posee *S. leeuwenhoekii* C34 se decidió investigar las lipasas extracelulares que este microorganismo posee.

## OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general:

Estudiar una lipasa extracelular de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34.

### 2.2. Objetivos específicos:

- Identificación bioinformática de lipasas extracelulares presentes en el genoma de *S. leeuwenhoekii* C34.
- Sobre-expresión de una enzima lipasa en *S. leeuwenhoekii* C34.
- Determinar la localización de la enzima sobre-expresada.
- Analizar y comparar la actividad lipolítica de la cepa de *S. leeuwenhoekii* C34 que sobre-expresa la enzima de interés y la cepa silvestre.
- Expresar heterológamente la enzima seleccionada en *Escherichia coli* Rosetta 2.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 3.1 Reactivos empleados.

Acrilamida y bisacrilamida de grado electroforético, 4-nitrofenil palmitato, ácido deoxicolato, goma arábica, SDS, EDTA y antibióticos (Sigma). Agarosa de grado electroforético (Invitrogen). Marcador de peso molecular 1 kb y estándar de proteína de amplio rango pre teñido (Fermentas). Glicerol, glucosa, tris-base (Merck). B-marcaptoetanol (JT Baker). Extracto de levadura, extracto de malta y triptona (Difco laboratories). TEMED y DTT (Biorad). Enzimas de restricción *NdeI*, *HindIII*, *XhoI*, T4 DNA ligasa y DNA polimerasa phusion (New England Biolabs). Plasmid DNA mini kit I, gel extraction kit (OMEGA bio-tek).

### 3.2 Cepas y cultivos bacterianos.

Para la producción de los plásmidos pIJ10257 y pEt22B(+) se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , la cual fue crecida durante 16h en caldo Luria Bertani (LB) con higromicina (80  $\mu$ g/mL) y ampicilina (100  $\mu$ g/mL), respectivamente.

Para la expresión heteróloga se utilizó la cepa de *E.coli* Rosetta 2 la cual fue crecida en medio LB agar suplementado con cloranfenicol (50  $\mu$ g/mL) y ampicilina (100  $\mu$ g/mL). Para la producción de la proteína recombinante, la cepa transformada fue cultivada en matraces de 250 mL que contenían 50 mL de medio Terrific Broth (TB) con cloranfenicol (25  $\mu$ g/mL) y ampicilina (50  $\mu$ g/mL).

Para la sobreexpresión en *Streptomyces* se utilizó la cepa *S. leeuwenhoekii* C34. La cepa fue inoculada con  $3 \times 10^3$  UFC en matraces de 500 mL con 150 mL de medio TBS-YEME.

Posteriormente, fueron incubados a 30°C con agitación constante de 250 rpm por 2 a 5 días.

### 3.3 Búsqueda bioinformática de lipasas extracelulares.

Se utilizó la base de datos de NCBI, la herramienta BLAST y el programa **Artemis 16.0.0** para la búsqueda de enzimas putativas en el genoma de *S. leeuwenhoekii* C34 (código de acceso: GCA\_001013905.1). Mediante el programa **SignalP4.1** (Disponible en: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) se evaluó la presencia de péptido señal de exportación de las lipasas putativas encontradas y se seleccionó una de estas para ser estudiada. También se utilizó el programa **Predictprotein** (disponible en: <https://www.predictprotein.org/>) para evaluar la presencia de puentes de disulfuro entre las cisteínas de la proteína seleccionada.

### 3.4 Construcción del plásmido LIP.

Se amplificó a partir de ADN genómico de *S. leeuwenhoekii* C34 el gen *sle\_62990* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para esto se utilizaron los cebadores SR001: 5' -gagagtac**catatg**cccaga- 3' (forward) y SR002: 5'-**ttaagctt**gcgtgcaacgaactctc- 3' (reverse), los cuales incorporan un sitio de restricción para las enzimas *NdeI* e *HindIII*, respectivamente (en negrita). El producto de PCR fue purificado mediante electroforesis en gel de agarosa y extraído con el kit E.Z.N.A Gel extraction (Omega bio-tek). Posteriormente, fue digerido y ligado al plásmido pIJ10257 (previamente tratado con las mismas enzimas de restricción). La construcción resultante se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$  electro competentes. Después de seleccionar a las colonias positivas con higromicina (80  $\mu$ g/mL), se purificó el plásmido con el kit E.Z.N.A plasmid DNA mini a partir de un cultivo líquido de un clon positivo. El fragmento clonado en el plásmido fue enviado a secuenciar a Macrogen

(<https://dna.macrogen.com/esp/>). La construcción del plásmido pIJ10257 con el gen *sle\_62990* bajo el alelo del promotor *ermE\** fue nombrado plásmido LIP y fue utilizado para la sobre-expresión en *S. leeuwenhoekii* C34.

### 3.5 Generación de plásmido LIPCOL.

Se realizó PCR utilizando como templado el plásmido LIP y los partidores SR003: 5'-ggaaggaagg**catatg**gaaccctgaacgtcgctgg- 3' (forward) y SR004: 5' –**attaagctt**ctcgagtcaatggtgatggtgatggtggccgccgaggcccacggccgt -3' (reverse), los cuales poseen sitios de restricción para ser tratados con las enzimas *NdeI* y *XhoI*, respectivamente. El producto de PCR se purificó a través de electroforesis en gel de agarosa utilizando el kit E.Z.N.A Gel extraction. El ADN obtenido fue tratado con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*. Posteriormente, fue ligado al vector pET22b(+) (tratado con las mismas enzimas de restricción). Con el producto de ligación, se procedió a transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes. Después de seleccionar unas de las colonias positivas con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) se purificó el plásmido mediante el kit E.Z.N.A plasmid DNA mini. Posteriormente, se secuenció utilizando los cebadores T7 universal (MACROGEN). La construcción obtenida fue nombrada plásmido LIPCOL y se utilizó para la expresión heteróloga en *E.coli* Rosetta 2.

### 3.6 Transformación de *S. leeuwenhoekii* C34 y generación de la cepa LIP.

Se transformó la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002 con el plásmido LIP. Las colonias transformadas fueron seleccionadas con higromicina (80  $\mu$ g/mL), cloranfenicol (50  $\mu$ g/mL) y kanamicina (50  $\mu$ g/mL). A partir de una de las colonias positivas se realizó un cultivo líquido y se siguió el protocolo descrito en Castro, J. F. (2015). Se transformó a *S. leeuwenhoekii* mediante la conjugación, para esto se realizó el co-cultivo en medio SFM de la cepa de *E. coli* ETZ LIP con esporas de *S. leeuwenhoekii* C34 por 24 h. Trascorrido

este periodo de tiempo se agregó una solución que contenía los antibióticos higromicina y ácido nalidixico. La cantidad de antibiótico fue considerada en razón del volumen de medio SFM en la placa, de esta forma se dejó la concentración final de higromicina en 80 µg/mL y ácido nalidixico en 25 µg/mL. Después de un periodo de 3 días de incubación se aislaron las colonias resistentes y se corroboró la transformación mediante PCR de colonia utilizando los cebadores GBA001: 5'- ccggttgtaggatcgtcta- 3' (forward) y GBA002: 5'- tcatctcgttctccgctcat- 3 (reverse), con los cuales se verificó el peso molecular del amplificado mediante una electroforesis en gel de agarosa. La cepa de *S. leeuwenhoekii* C34 transformada fue nombrada como cepa LIP. Posteriormente, se realizaron stocks de esporas de la cepa LIP y de la cepa wild-type (WT), los cuales fueron cuantificados mediante el método de unidades formadoras de colonias.

### 3.7 Transformación de *E. coli* Rosetta2 y generación de la cepa LIPCOL.

Se transformaron células de *E.coli* Rosetta2 quimicompetentes con el plásmido LIPCOL. Después de seleccionar las colonias positivas con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (50 µg/mL) se corroboró la transformación mediante PCR de colonia. Para esto, se utilizaron los cebadores T7 universales, con los cuales se verificó el peso molecular del amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, se generaron stock en glicerol 40% de la cepa de *E. coli* Rosetta2 transformada, la cual fue nombrada cepa LIPCOL.

### 3.8 Expresión de la proteína SLE\_62990 en *Streptomyces leeuwenhoekii* C34.

La cepa LIP y WT fueron cultivadas durante cinco días en medio TBS-YEME. Cada 24 horas de incubación se extrajo una muestra del cultivo de 15 mL, la cual fue manejada a 4°C durante todo el tratamiento posterior. Se separó el sobrenadante de las células mediante centrifugación a 10000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, el pellet fue lavado

tres veces con 5 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7 y sonificado hasta la clarificación. La fracción celular soluble fue separada mediante centrifugación y la fracción insoluble fue resuspendida en 500  $\mu$ L del mismo buffer. Se procedió a medir la actividad lipasa del sobrenadante del cultivo, fracción soluble y fracción insoluble de las células mediante el ensayo de actividad. También se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes con las tres muestras.

### 3.9 Expresión heteróloga del gen *sle\_62990* en *E.coli* Rosetta 2.

A partir de un cultivo de 16 h en medio LB de la cepa LIPCOL, se preparó un cultivo con una OD<sub>600</sub> de 0.05 en medio TB. Cuando la densidad óptica alcanzó el valor OD<sub>600</sub> de 0.8 se indujo la producción de proteína recombinante mediante la adición de IPTG en concentraciones de 0.05, 0.1, 0.2 y 0.3 mM. Seguidamente, se tomó una muestra de 2 mL a 2 y 3 h de incubación. Las muestras obtenidas fueron centrifugadas a 10000 rpm. El precipitado de células fue lavado 3 veces con Tris-HCl 50 mM pH 7 y sonificado con pulsos de 20 segundos y 40 segundos de descanso hasta que se alcanzó la clarificación de la muestra. La solución clarificada fue centrifugada durante 10 min a 10000 rpm. Se conservó el sobrenadante, el cual correspondía a la fracción celular soluble. Por otra parte, el pellet obtenido fue re-suspendido en 200  $\mu$ L del mismo buffer Tris-HCl 50 mM pH 7, dando origen a la fracción celular insoluble.

Se midió la actividad lipasa de las muestras obtenidas a distintos tiempos y concentraciones de IPTG. También se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida 12% en condiciones denaturantes para la visualización de la banda correspondiente a la proteína expresada.

### 3.10 Ensayo de actividad lipasa.

La solución sustrato con la cual se midió la actividad lipasa fue preparada en el momento de uso y de la siguiente forma: 103 mg de *p*-nitrofenil palmitato fueron disueltos en 5 mL de dioxano, estos fueron mezclados con 45 mL de Tris-HCl 0.05 M pH 8 que contenía 50 mg de goma arábica y 103 mg de ácido deoxicolato. Los 50 mL resultantes fueron sonicados durante 30 segundos. Para realizar el ensayo de actividad lipasa, se alicuotó 1 mL de la solución sustrato en tubos eppendorf de 1,5 mL. Estos fueron ambientados en bloque térmico durante 15 min a la temperatura correspondiente (45°C para los ensayos iniciales y 20° a 90°C para los ensayos de termo afinidad). La reacción enzimática era iniciada al agregar 10 µL de muestra, seguido de 10 minutos de incubación a la misma temperatura de ambientación. Posteriormente, la reacción era detenida mediante la incubación en hielo durante 5 minutos. Trascurrido este tiempo, se procedió a medir la absorbancia a 405 nm en placas de 96 pocillos.

### 3.11 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida a las diferentes muestras para evidenciar la sobreexpresión y localización de la enzima. Se utilizó una concentración de un 4% de poliacrilamida para concentrar y un 12% para la separación. Las muestras de fracción insoluble y fracción soluble, tanto de *E. coli*, como de *S. leeuwenhoekii* C34, fueron mezcladas directamente con el buffer 5X denaturante y calentadas a 90°C por 10 minutos. Las muestras de sobrenadante tuvieron que ser concentradas con Unidades Concentradoras de 10 kDa (siguiendo el protocolo del fabricante Amicon®) antes de ser mezclarlas con el buffer 5X.

El gel de poliacrilamida fue corrido a un voltaje fijo de 150 V por 1 hora. Se realizó tinción con azul de coomassie para las muestras de la fracción insoluble y fracción soluble. Mientras que para las muestras obtenidas del sobrenadante se realizó tinción con nitrato de plata.



### 3. RESULTADOS.

#### 4.1. Búsqueda bioinformática de lipasas extracelulares en el genoma de *S. leeuwenhoekii* C34:

Se realizó la búsqueda de lipasas putativas en el genoma de *S. leeuwenhoekii* C34. Por medio de la herramienta BLAST, se buscaron las anotaciones de genes putativos con presencia de dominios Alpha-beta hidrolasa o GDSL-hidrolasa. Se analizaron los motivos conservados de cada gen encontrado y también se evaluó la presencia de péptido señal mediante el programa SignalP4.1. Con esta información se generó una lista de posibles lipasas extracelulares (Tabla 1). Utilizando BLAST, se encontró que dos genes presentaban un homólogo ya caracterizado en *Streptomyces coelicolor* A(3). Finalmente, se seleccionó el gen *sle\_62990* de *S. leeuwenhoekii* C34 para ser estudiado, debido a que el homólogo SCO7513 en *Streptomyces coelicolor* A(3) presentaba mayor actividad contra *p*-nitrofenil palmitato y también presentaba una mayor temperatura óptima que la otra lipasa caracterizada (Côté & Shareck, 2008.). El gen *sle\_62990* de *S. leeuwenhoekii* C34 presenta un 66% de identidad y un 92% de cobertura respecto a la enzima SCO7513. Con el programa SignalP4.1 se pudo identificar un péptido señal de 33 aminoácidos en la secuencia de la proteína SLE\_62990 (Figura 1). También, mediante el programa Predictprotein se identificó la posible presencia de tres puentes de disulfuro entre las cisteínas 65 y 152, 89 y 205 y entre la 138 y 254.

Tabla 1: Genes de posibles lipasas extracelulares encontrados en el genoma de *S. leeuwenhoekii* C34. (\*) Genes con homólogo ya caracterizado en *Streptomyces coelicolor*.

Tipo de lipasa putativa	Gen
Lipasa A/B	<i>sle_28770</i>
Lipasa A/B	<i>sle_04860</i>
Lipasa A/B	<i>sle_02250</i>
Lipasa A/B	<i>sle_66020</i>
Lipasa A/B	<i>sle_31130</i>
Lipasa GDSL	<i>sle_38400</i>
Lipasa GDSL	<i>sle_66520</i>
Lipasa GDSL	<i>sle_62990*</i>
Lipasa GDSL	<i>sle_53990*</i>

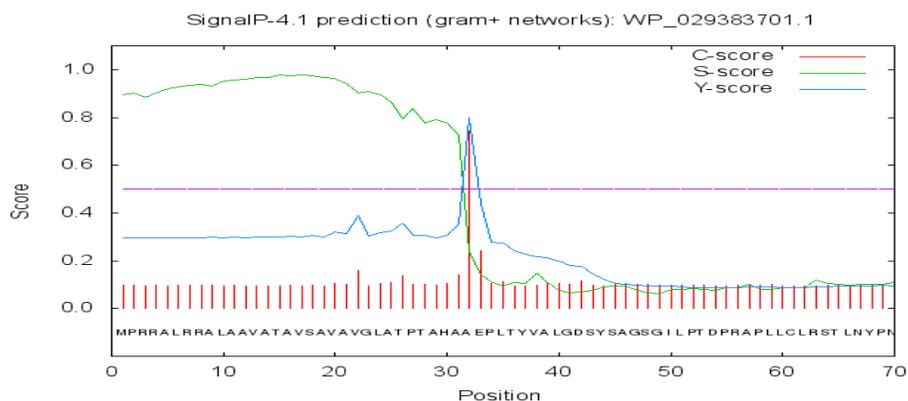
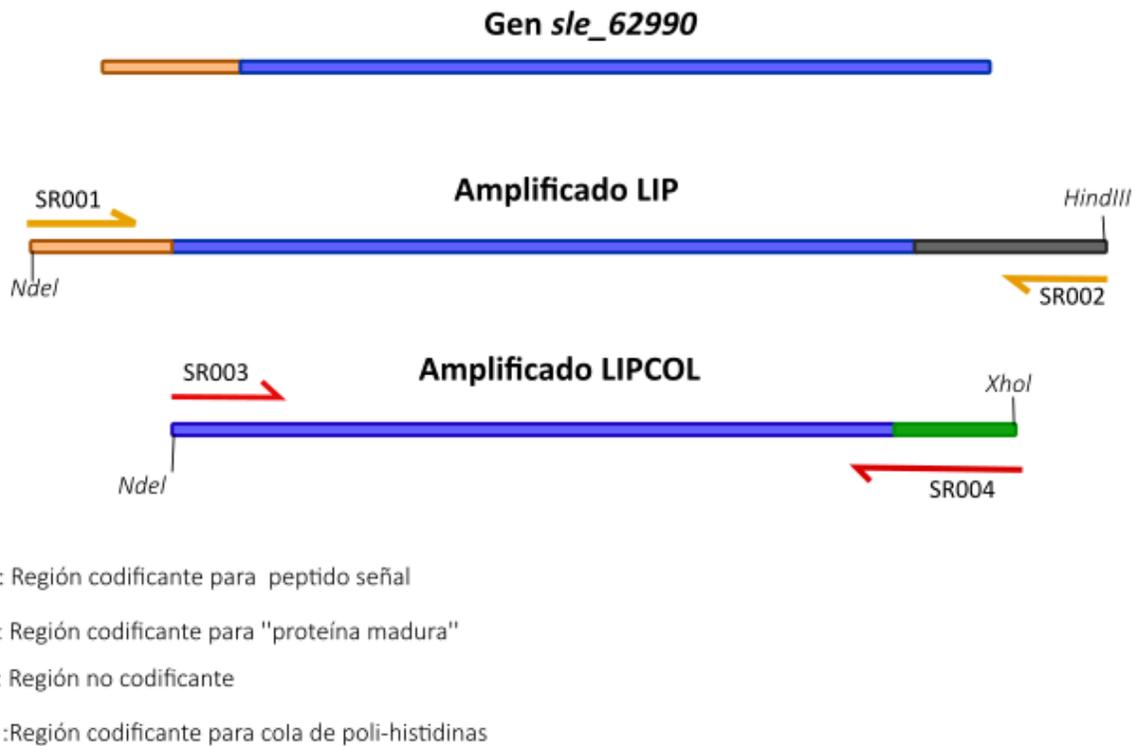


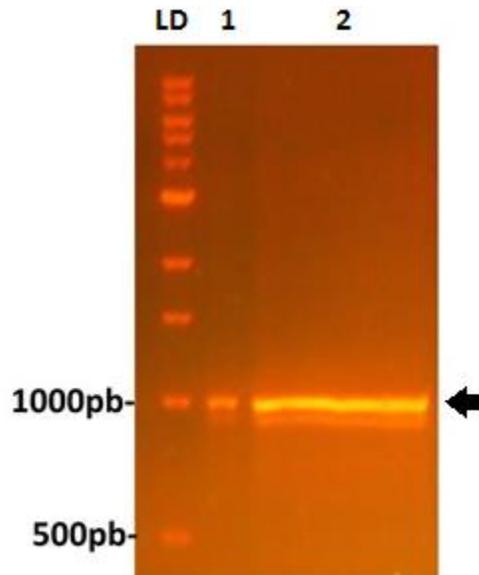
Figura 1: Output del programa SignalP-4.1 utilizando la secuencia aminocídica del gen *sle\_62990*. Basado en los parámetros C, S e Y. El parámetro C, corresponde al puntaje otorgado por posibles sitios de corte por proteasas. S, corresponde al puntaje otorgado por la señal hidrofóbica e Y corresponde a la suma del decaimiento de la señal hidrofóbica con el reconocimiento de un sitio de corte.



**Figura 2: Representación gráfica de los fragmentos LIP y LIPCOL obtenidos mediante PCR.** Con los cebadores SR001 y SR002 se obtuvo el fragmento LIP, el cual fue ligado al plásmido pIJ10257 utilizando para la sobreexpresión en *S. leeuwenhoekii* C34. Con los pares SR003 y SR004 se obtuvo el fragmento LIPCOL, el cual fue ligado al plásmido pET22b(+) utilizado para la expresión heteróloga en *E. coli* Rosetta 2.

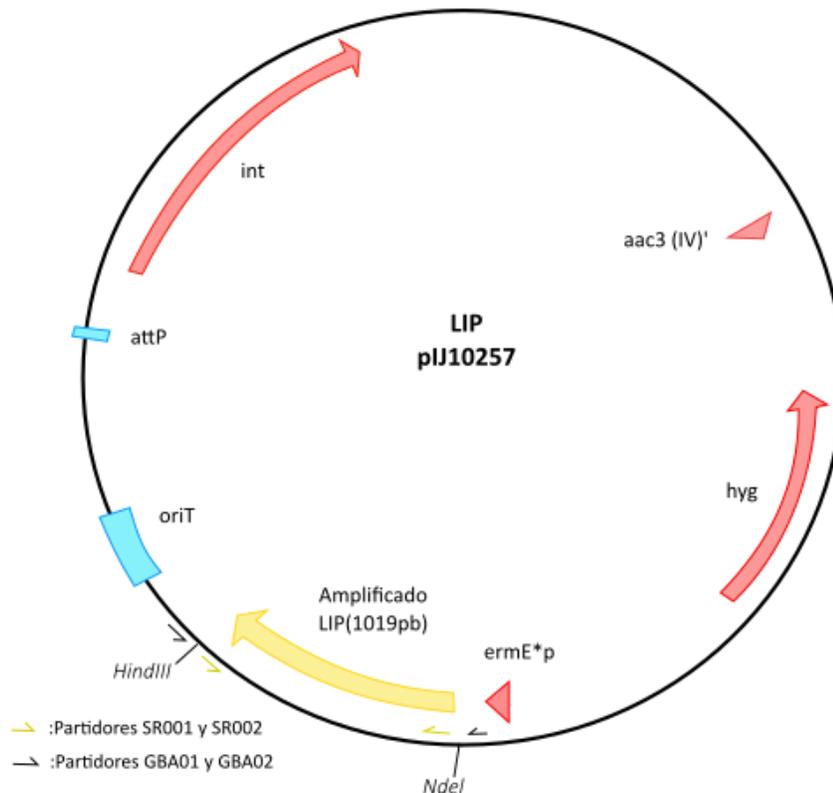
#### 4.2 Generación del plásmido LIP.

Utilizando el programa Artemis 16.0.0 para la visualización del genoma y el programa primer3plus (disponible en: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) se buscaron los cebadores más óptimos. Sin embargo, se tuvo problemas para obtener un par de cebadores que hibriden exactamente en los extremos 5' y 3' de la región codificante del gen *sle\_62990*. Como solución se diseñaron los cebadores SR001 y SR002, que logran amplificar toda la región de ADN codificante (CDS) del gen *sle\_62990*, pero también incorporan un sitio no codificante en el extremo 3' (Figura 2). Utilizando los cebadores SR001 y SR002, se logró amplificar y purificar un segmento de 1019pb que contenía el gen *sle\_62990* generando el amplificado LIP (Figura 3).

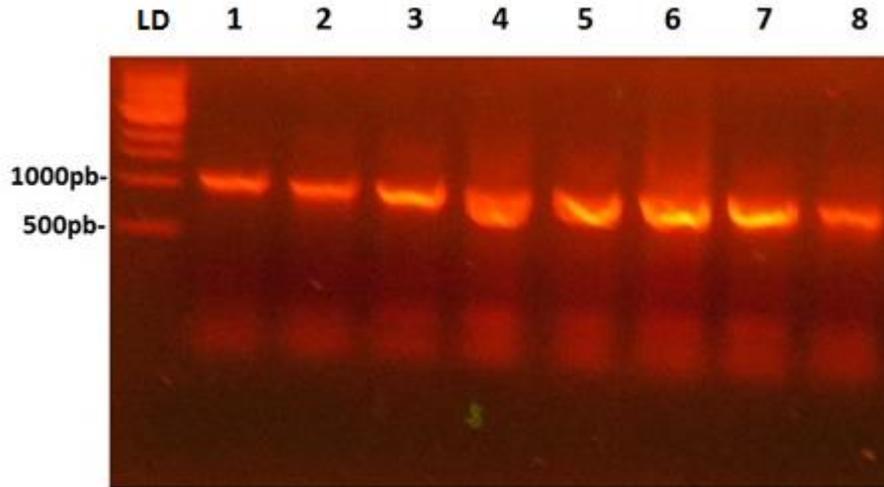


**Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa al producto de PCR que contiene el amplificado LIP. LD:** marcador 1 kb. **Carril 1:** alícuota de lo cargado en el carril 2. **Carril 2:** producto de PCR utilizando DNA genómico de *S. leeuwenhoekii* C34 y los cebadores SR001 y SR002. Se señala con una flecha negra el amplificado de 1 kb que contiene el gen *sle\_62990*.

Después de purificar la banda extraída, fue digerida con las enzimas de restricción *NdeI* e *HindIII* y posteriormente ligada al plásmido pJJ10257 para dar origen al plásmido LIP (Figura 4). Con el producto de ligación obtenido se procedió a transformar células de *E.coli* DH5α quimiocompetentes. Se seleccionaron las colonias transformantes con higromicina (80 µg/mL). Ocho colonias positivas fueron seleccionadas para realizar PCR de colonia utilizando los partidores SR001 y SR002. En el gel de electroforesis se determinó que las 8 colonias seleccionadas presentaban el amplificado de 1 kb que confirma la transformación con el plásmido LIP (Figura 5). Fueron seleccionadas las colonias correspondientes a los carriles 2, 3 y 7 para purificación del ADN plasmidial.

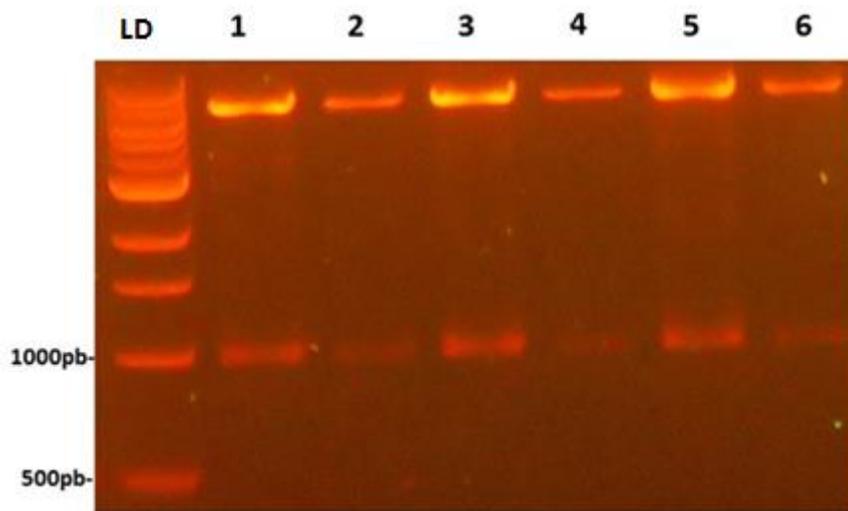


**Figura 4: Esquema del plásmido LIP.** Utilizado para la sobre-expresión del gen *sle\_62990* en *S. leeuwenhoekii* C34. Presenta el amplificado LIP bajo el alelo del promotor fuerte constitutivo *ermE\**. Además, presenta los genes que codifican para la integrasa y para la resistencia a higromicina. Posee un origen de transferencia y el sitio attP.



**Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa al producto de PCR de colonia realizado a los transformantes DH5 $\alpha$  LIP. LD: marcador 1 kb. Carriles del 1 al 8: colonia positiva (numerada del 1 al 8, respetivamente) seleccionada para realizar PCR de colonia.**

Se realizaron digestiones con las enzimas *NdeI* e *HindIII* a los plásmidos purificados desde las colonias positivas. Mediante una electroforesis en gel de agarosa se confirmó la presencia del inserto de 1 kb en los tres plásmidos seleccionados (Figura 6). Se seleccionaron los plásmidos de las colonias 2 y 3 para ser secuenciados utilizando los partidores GBA001 y GBA002. Los resultados de la secuenciación corroboraron que la secuencia correspondía a la deseada, que el inserto no presentaba mutaciones y que el gen se encontraba en el marco de lectura correcto.

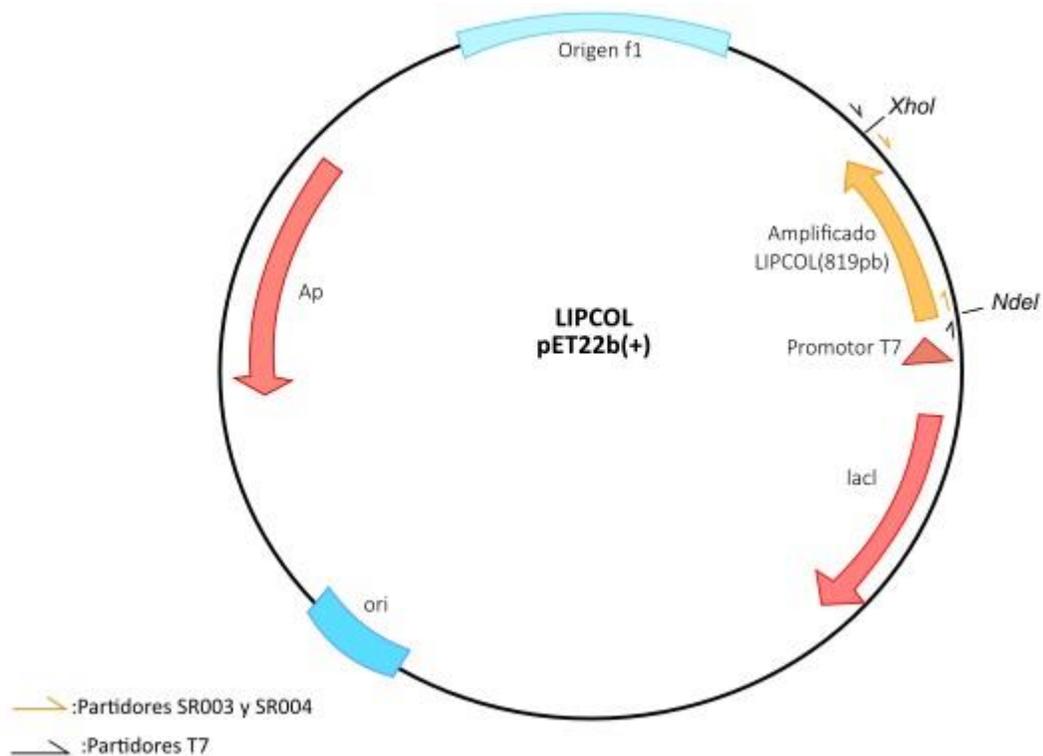


**Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa al producto de doble digestión realizado a los plásmidos extraídos de las colonias positivas. LD: marcador 1 kb. Carriles 1 y 2: producto de digestión del plásmido extraído del cultivo de la colonia 2 y su dilución  $\frac{1}{4}$ , respectivamente. Carriles 3 y 4: producto de digestión del plásmido extraído del cultivo de la colonia 3 y su dilución, respectivamente. Carriles 5 y 6: producto de digestión de plásmido extraído del cultivo de la colonia 7 y su dilución, respectivamente.**

#### **4.3 Generación del plásmido LIPCO.**

Se diseñaron los partidores SR003 y SR004 para la expresión heteróloga en *E.coli*. El amplificado del gen *sle\_62990* modificado (amplificado LIPCOL) utilizando este par de partidores se encuentra ejemplificado en la Figura 2. Por un lado, se descarta la secuencia codificante para el péptido señal de 33aa en extremo N-terminal. Por otro lado, en el extremo C-terminal, se descarta el codón de termino endógeno y se agregan dos glicinas más cinco histidinas seguidas de un nuevo codón de termino.

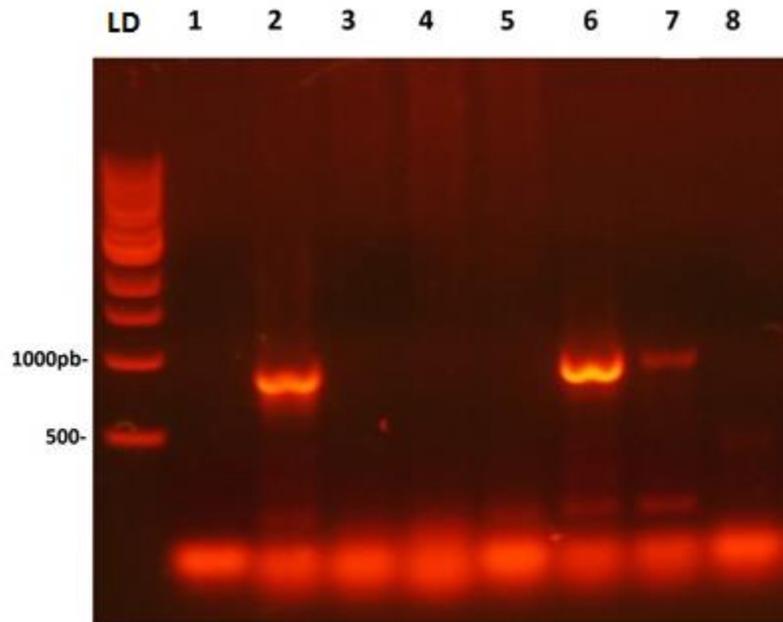
Se realizó un PCR utilizando estos partidores y como templado se utilizó el plásmido LIP. Se purifico la banda de 819pb a partir de una electroforesis en gel de agarosa al producto de PCR. La banda obtenida fue tratada con las enzimas *NdeI* y *XhoI*, y posteriormente fue ligada al plásmido pET22b (+) para dar origen al plasmido LIPCOL (Figura 7).



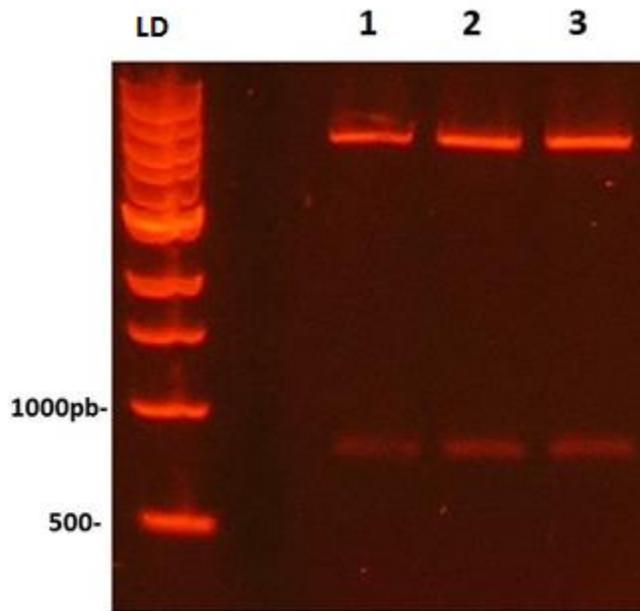
**Figura 7: Esquema del plásmido LIPCOL.** Utilizado para la expresión heteróloga en *E. coli* Rosetta 2. El amplificado LIPCOL se encuentra bajo el alelo del promotor del fago T7. Presenta los genes que codifican para el inhibidor lac y para la resistencia a ampicilina. Además, presenta un origen de replicación y el origen f1.

Utilizando esta construcción (LIPCOL) se transformó la cepa de *E.coli* DH5 $\alpha$ . Se seleccionaron 8 colonias con las cuales se realizó un PCR de colonia utilizando los primer SR003 y SR004. Tres colonias transformadas con la construcción LIPCOL fueron confirmadas mediante PCR y electroforesis en agarosa (Figura 8). El ADN plasmidial de estas colonias fue purificado y con este se realizó una doble digestión con las enzimas de restricción para confirmar la presencia del inserto de 819 pb que contiene el gen *s/e\_62999* modificado. Las digestiones fueron visualizadas en una electroforesis en gel de agarosa, lo que permitió la confirmar la presencia del inserto de 819 pb en los 3 plásmidos seleccionados (Figura 9). Se seleccionaron los plásmidos de la colonia 2 y 6 (LIPCOL2 y

6) para ser secuenciados (MACROGEN) y de esta forma se corroboró el correcto marco de lectura y la ausencia de mutaciones.



**Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa al producto PCR de colonia realizado a los transformantes DH5 $\alpha$  LIPCOL. LD: marcador 1 kb. Carriles del 1 al 8: colonia positiva (numerada del 1 al 8, respectivamente) seleccionada para realizar PCR de colonia. Se confirma la presencia del amplificado de 819pb en las colonias correspondientes a los carriles 2, 6 y 7.**

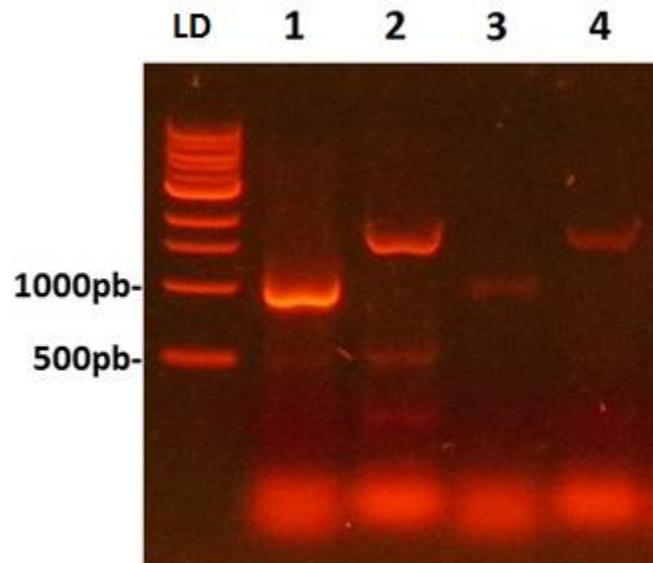


**Figura 9: Electroforesis en gel de agarosa al producto de digestiones realizados a los plásmidos LIPCOL 2, 6 y 7. LD:** marcador 1kb. **Carril 1:** producto de doble digestión realizada al plásmido LIPCOL 2. **Carril 2:** producto de doble digestión realizada al plásmido LIPCOL 6. **Carril 3:** Producto de doble digestión realizada al plásmido LIPCOL 7. Se corrobora la presencia del fragmento de 819 pb en los carriles 1, 2 y 3.

#### 4.4 Transformación de *S. leeuwenhoekii* C34 con el plásmido LIP.

Se transformaron células de *E. coli* ET12567/pUZ8002 quimiocompetentes con el plásmido LIP y se seleccionó a los transformantes con el medio LB agar higromicina, cloranfenicol y kanamicina. Posteriormente, se transformaron esporas de *S. leeuwenhoekii* C34 mediante la conjugación con la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002 transformada con el plásmido LIP. Una vez que la célula de *E. coli* transfiere el plásmido pIJ10257 a *S. leeuwenhoekii* C34 se expresa la recombinasa del fago  $\Phi$ C31. Esta, a su vez, reconoce los sitios *attB* y *attA* en el genoma y en el plásmido pIJ10257, produciéndose la recombinación. De esta forma, la inserción del plásmido en el genoma de *S. leeuwenhoekii* C34 le confiere resistencia a higromicina.

Después de seleccionar las colonias de *S. leeuwenhoekii* transformantes con higromicina, se realizó un PCR de colonia utilizando los partidores GBA001 y GBA002. Mediante una electroforesis en gel de agarosa al producto de PCR se pudo verificar la presencia de una banda de 1 kb (Figura 10, carriles 1 y 3) confirmando la transformación de *S. leeuwenhoekii* C34 con el plásmido LIP.

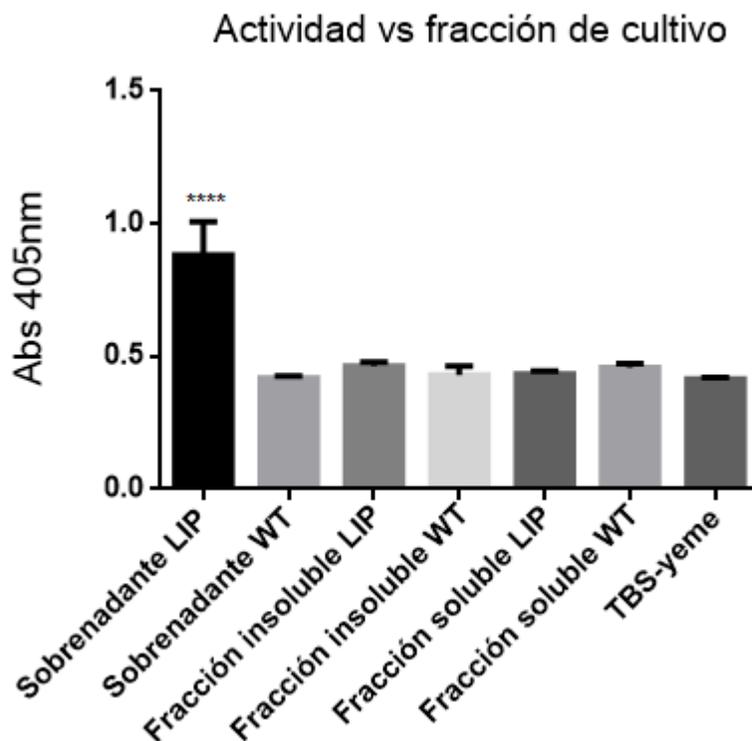


**Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa al producto de PCR realizado al stock de esporas de la cepa LIP. LD: marcador 1 kb. Carril 1:** producto de PCR realizado al stock de esporas utilizando los partidores GBAs. **Carril 2:** producto de PCR realizado al stock de esporas utilizando partidores SR005 y SR006, que amplifican una región genómica de 1500 pb, aproximadamente (Control positivo de la exposición del DNA genómico). **Carril 3 y 4:** dilución 1/2 de la muestra cargada en los carriles 1 y 2, respectivamente. Se observa la presencia del amplificado de 1 kb en carril 1 y 3.

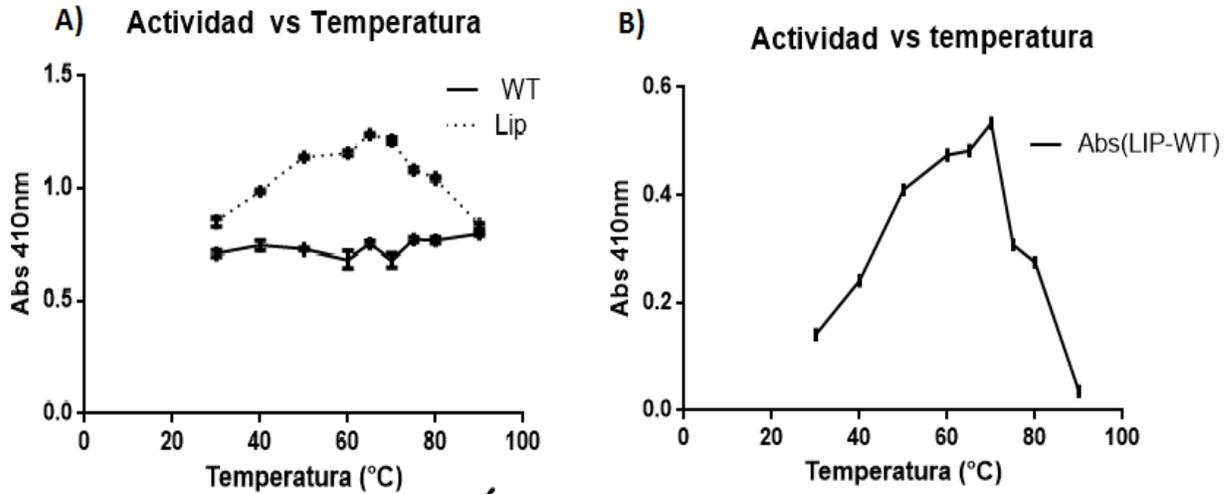
#### **4.5 Evaluación de la sobre-expresión de la proteína SLE\_62990 en *Streptomyces leeuwenhoekii* C34.**

A partir de un cultivo líquido de las cepas LIP y WT de *S. leeuwenhoekii* C34 se generaron las tres fracciones del cultivo: el sobrenadante del cultivo, extracto celular soluble y extracto celular insoluble. Se midió la actividad lipasa de los tres tipos de muestras. Se

pudo observar que solo el sobrenadante de la cepa LIP presentaba actividad lipasa contra el *p*-nitrofenil palmitato (Figura 11). Como parte de otro ensayo, se midió la actividad lipasa del sobrenadante a diferentes temperaturas (Figura 12). Con este experimento se pudo evidenciar que el máximo de actividad lipasa fue registrado a los 65°C y fue de 1,59 U/mL.

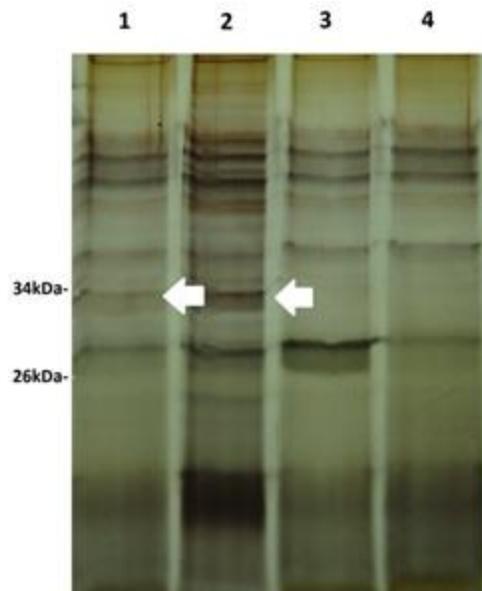


**Figura 11: Resultados obtenidos del ensayo de actividad lipasa realizado con las distintas fracciones de cultivo.** Se aprecia que solamente el sobrenadante de la cepa LIP presenta una actividad lipolítica diferente a la del control (TBS-YEME).



**Figura 12: Resultados de los ensayos de actividad lipasa realizados a distintas temperaturas de incubación.** **A)** Curva de absorbancia obtenida a diferentes temperaturas de incubación, utilizando los sobrenadantes de la cepa WT (---) y la cepa LIP (. . . .). **B)** Curva obtenida de la resta de la absorbancia obtenida por el sobrenadante LIP menos la del WT. El máximo de actividad del sobrenadante de la cepa LIP se obtiene a los 65°C.

Para corroborar la sobreexpresión de la proteína SLE\_62990, primero se realizaron dos predicciones del peso molecular de la proteína mediante el programa ExPASy (disponible en: [https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)). En una se incluyó toda la región codificante del gen *sle\_62990* y en la otra se excluyó el péptido señal predicho por el programa SignalP4.1. La predicción del peso molecular fue de 29 kDa y 27 kDa, respectivamente. Teniendo en cuenta esta predicción, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% con las muestras del sobrenadante de cultivo. Se pudo confirmar la presencia de una banda de 32 kDa aproximadamente solo en las muestras de sobrenadante de la cepa LIP y no el sobrenadante de la cepa WT (Figura 13).



**Figura 13: Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con tinción de plata a muestras concentradas de sobrenadantes de la cepa LIP y WT.** La proteína total cargada de cada muestra fue de 4  $\mu\text{g}$ . **Carril 1 y 2:** sobrenadante LIP de 48 h y 72 h de cultivo, respectivamente. **Carril 3 y 4:** sobrenadante WT de 48 h y 72 h de cultivo, respectivamente. Se señala con flechas blancas una banda de 32 kDa aproximadamente, la cual podría corresponder a la enzima SLE\_62990.

#### **4.6 Evaluación de la expresión heteróloga de la proteína SLE\_62990 en *E. coli* Rosetta 2.**

Se realizó un cultivo líquido de la cepa *E. coli* Rosetta2 LIPCOL. Después de alcanzar la  $\text{OD}_{600} = 0,2$  se realizaron inducciones con: 0.05, 0.1, 0.2 mM de IPTG y se tomaron muestras de cultivo a las 2 y 3 h después de la inducción. Posteriormente, se lisaron las células y obtuvieron las muestras de la fracción celular soluble y de la fracción celular insoluble.

A las muestras obtenidas se le midió la actividad lipasa mediante el ensayo de actividad contra el *p*-nitrofenil palmitato. Se obtuvo que las muestras obtenidas del extracto celular soluble utilizando una concentración de 0.05 mM de IPTG para la inducción presentaba una pequeña diferencia en la absorbancia a 405 nm, respecto al control sin transformar.

Por otra parte, el ensayo de actividad realizado con todas las muestras de extracto celular insoluble presentó una absorbancia similar a la del control (Figura 14).

Para corroborar la expresión heteróloga de la proteína SLE\_62990 modificada se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. Se pudo evidenciar que solo en los carriles de las muestras de extracto celular insoluble, al utilizar una concentración igual o superior a 0.1 mM de IPTG, presentaban una banda de 32 kDa aproximadamente (Figura 15B, flecha negra)

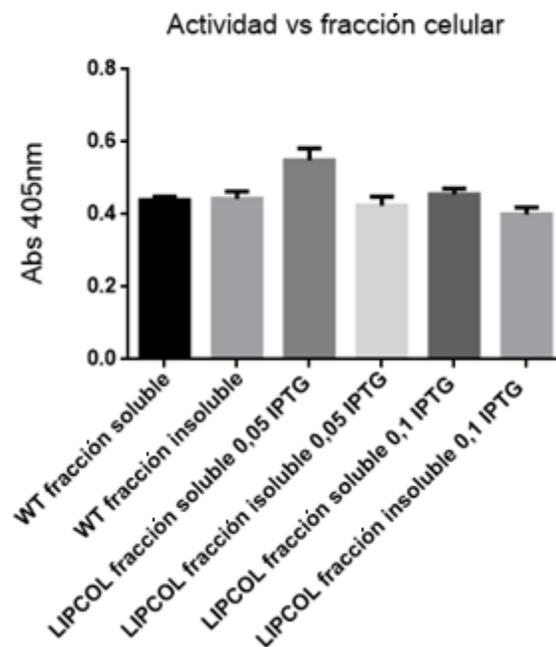
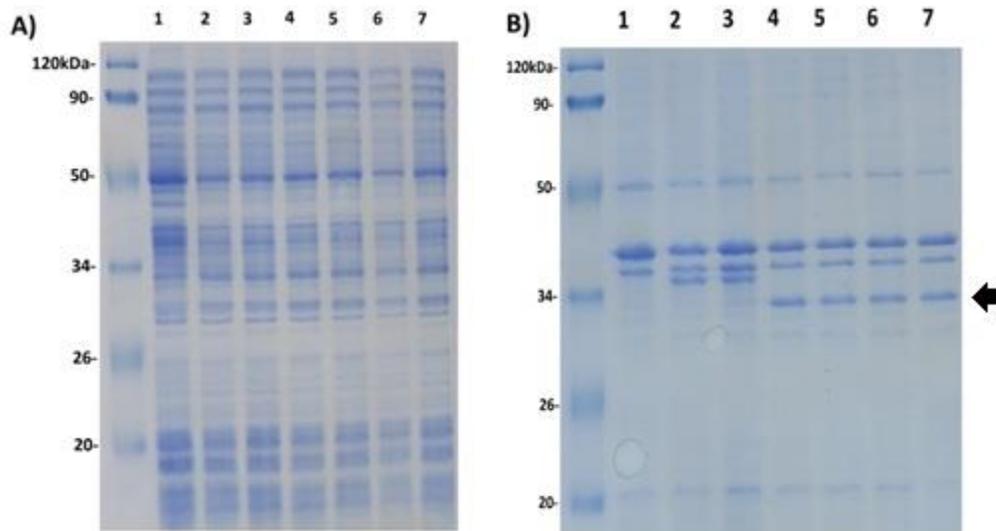


Figura 14: Resultados del ensayo de actividad de las diferentes fracciones de cultivo obtenidas de la inducción con 0.05 y 0.1 mM IPTG.



**Figura 15: Electroforesis en gel de poliacrilamida a muestras obtenidas de las distintas inducciones. A)** Representa las muestras obtenidas de la fracción soluble. **B)** Muestras de la fracción insoluble. **LD:** marcador de peso molecular MW **Carril 1:** fracciones obtenidas de la cepa Rosetta 2 sin transformar. **Carril 2 y 3:** muestras de la cepa LIPCOL inducida con 0.05 mM de IPTG en 2 y 3 h, respectivamente. **Carril 4 y 5:** muestras de la cepa LIPCOL inducida con 0.1 mM de IPTG recolectadas en 2 y 3 h, respectivamente. **Carriles 6 y 7:** muestras de la cepa LIPCOL inducida con 0.2 mM IPTG recolectadas en 2 y 3 h, respectivamente. En la figura se indica con una flecha negra la presencia de una banda de 32 kDa en las muestras de la fracción insoluble (B) cuando se indujo con 0.1 y 0.2 mM de IPTG (Carriles del 4 al 7).

#### 4. DISCUSIÓN.

En este trabajo se realizó la búsqueda bioinformática de enzimas lipasas en el genoma de *S. leeuwenhoekii* C34. La búsqueda fue orientada hacia las lipasas debido al gran potencial biotecnológico que estas enzimas presentan, ya que pueden catalizar reacciones en interfaces lípido-agua y también porque han demostrado ser un herramienta útil para la hidrólisis y/o síntesis estereoespecífica de una gran variedad de esterres valiosos (Jaeger et al.1994). El gen objetivo de este estudio fue el gen *sle\_62990*, el cual codificaba para una lipasa putativa GDSL-SGNH. Mediante la herramienta BLAST se observó que la proteína SLE\_62990 presentaba varios homólogos cercanos en especies del genero *Streptomyces*. Además, presentaba el homologo SCO7513 en *S. coelicolor* A(3), el cual se encontraba caracterizado por Côté & Shareck (2008) y presentaba un 66% identidad y un 92% de cobertura respecto a la proteína SLE\_62990.

Como primera parte se procedió a diseñar los cebadores para la amplificación del gen *sle\_62990* a partir de ADN genómico de *S. leeuwenhoekii* C34 mediante PCR. Esto no estuvo exento de complicaciones debido a que el porcentaje de G+C que presenta esta especie es de un 72,76% (Gomez-Escribano, 2015). Lo cual, dificultó la selección del cebador reverso debido a la repetitividad de secuencias ricas en G+C en el extremo 3' de la región codificante (CDS) del gen *sle\_62990*. Esto llevó a que los cebadores seleccionados en primera instancia formaran estructuras secundarias estables al ser analizados por el programa Oligoanalyzer (disponible en: <https://www.idtdna.com/calc/analyzer> ). Como solución rápida y en desmedro de la posibilidad de modificar los nucleótidos de la región 3' del CDS se diseñó el cebador SR002 que hibridaba río abajo del codón de término (+232 pb), con el cual se pudo obtener un amplificado con el gen *sle\_62990* (Figura 2).

Mediante los análisis de la secuencia de la enzima SLE\_62990 con el programa SignalP4.1 se evidenció la presencia de péptido señal de exportación para Gram-positivo (Figura 1). Por lo tanto, era de esperar que dicha proteína se encontrara en el sobrenadante del cultivo. Para verificar la localización y funcionalidad de la enzima se realizaron ensayos de actividad lipasa con las diferentes fracciones del cultivo de la cepa LIP. Con esto se pudo evidenciar que solo el sobrenadante del cultivo de la cepa LIP presentaba actividad lipasa contra el *p*-nitrofenil palmitato (Figura 11). También, se realizó una electroforesis de proteínas con el sobrenadante de la cepa LIP, en la cual se pudo observar la presencia de una banda de un peso similar al de la predicción de la proteína SLE\_62990 (Figura 13). Estos resultados sugieren que la proteína SLE\_62990 estaba siendo sobre expresada y exportada al medio extracelular de la cepa LIP, corroborando lo predicho por el programa SignalP4.1, y que además la enzima presenta actividad lipolítica contra el sustrato *p*-nitrofenil palmitato. Sin embargo, sería de gran utilidad realizar un zimograma con los sobrenadantes de la cepa LIP y WT, y de esta forma verificar la actividad lipolítica directamente en el gel por parte de esta banda de 32 kDa.

Para ver la temperatura óptima de la enzima SLE\_62990 se realizaron ensayos de actividad a diferentes temperaturas con los sobrenadantes (Figura 12). Se pudo evidenciar que el sobrenadante de la cepa LIP presenta el máximo de actividad a 65°C correspondiente a 1,5905U/mL. Interesantemente, corresponden a 15°C más que el máximo de temperatura registrada por homólogo SCO7513 de la bacteria *S. coelicolor* A(3). Este resultado es interesante, ya que la actividad a alta temperatura representa una característica apetecida por la industria de las enzimas. Sin embargo, se tienen que realizar más experimentos para ver que otras características pueda presentar la enzima SLE\_62990, como por ejemplo evaluar estabilidad de la enzima a altas temperaturas, el pH óptimo y especificidad por otros sustratos lipídicos. No solo para ver la posibilidad de

algún uso comercial de esta enzima, sino que también para deslumbrar qué características particulares pueden presentar las enzimas de un microorganismo proveniente del desierto de Atacama.

Con la idea de obtener mayores concentraciones de la enzima activa se realizó la expresión heteróloga del gen *sle\_62990* en *E. coli* Rosetta2. Para esto se clonó el gen *sle\_62990* con una cola de histidinas y sin la secuencia codificante para el péptido señal en el plásmido pET22b(+). Por lo tanto, era de esperar que la proteína SLE\_62990 se expresara en el medio intracelular de *E. coli*. Para corroborar la expresión y funcionalidad de la enzima SLE\_62990 se midió la actividad lipasa de las distintas fracciones celulares obtenidas de la inducción con diferentes concentraciones de IPTG (Figura 14). Se observó que solo la fracción celular soluble inducida con 0.05 mM de IPTG presentaba una diferencia en la actividad respecto al control sin transformar. No obstante, mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida se pudo observar la presencia de una banda de 32 kDa, peso similar al de la predicción de la enzima SLE\_62990 modificada, en las muestras de la fracción insoluble (Figura 15B). Estos resultados demuestran que una gran cantidad de la enzima sobre-expresada se encontraba en la fracción insoluble y que esta no presentaba actividad lipasa. Esto se puede asociar a que la gran mayoría de la enzima SLE\_62990 inducida en *E. coli* no adquiere el plegamiento de la forma activa, formando cuerpos de inclusión, y que solo una pequeña fracción de la proteína inducida a bajas concentraciones de IPTG adquiere el plegamiento adecuado, la cual es detectada en la fracción celular soluble en los ensayos de actividad. Existen diversos factores que contribuyen a la obtención de proteínas mal plegadas en la expresión heteróloga. Por un lado está el estado redox del citoplasma, el cual mitiga la formación de puentes de disulfuro. (Hannig, & Makrides, 1998). Mediante el programa Predictprotein se predijo que la enzima SLE\_62990 presenta 3 posibles puentes de disulfuro, de esta forma, al

expresar esta enzima en el citoplasma de *E. coli* el estado redox del citoplasma puede impedir la formación de estos puentes de disulfuro y así facilitar la formación de agregados proteicos (Anné et al., 2014). Por otra lado, está la diferencia en la preferencia de codones de *E. coli* y *S. leeuwenhoekii* C34. En este estudio se clonó un gen proveniente de *S. leeuwenhoekii* C34 directamente en el plásmido pET22b (+) sin realizar ninguna modificación a los codones del gen. A pesar de que la cepa de *E. coli* Rosetta2 esta complementada con todos los tRNA, se tiene que considerar que el código genético es degenerado y que existen variaciones en términos de preferencia de codones y abundancia tRNA de un microorganismos a otro (Gustafsson et al., 2004). De esta forma, al no optimizar los codones del gen *sle\_62990* para la expresión en *E. coli* se corre el riesgo de interferir en el ritmo de traducción y plegamiento la proteína expresada heterológamente (Plotkin & Kudla, 2011). Así, la optimización de codones resulta ideal para la expresión heteróloga de proteínas. De forma análoga, al expresar la enzima SLE\_62990 en *S. leeuwenhoekii* C34 por medio de la cepa LIP se utilizó la misma maquinaria del organismo nativo del gen y así se logró evitar problemas que usualmente van de la mano con la expresión heteróloga de proteínas como la optimización de codones, el reconocimiento de péptido señal de exportación y formación de agregados insolubles (Terpe, 2006).

En el trabajo a futuro más próximo se planea la purificación de la enzima SLE\_62990, para lo cual se generaron varias herramientas a lo largo de este trabajo que facilitan el cumplimiento de este objetivo. Por un lado, se generó la cepa LIP que sobre-expresa la enzima SLE\_62990. Utilizando el sobrenadante de un cultivo de esta cepa se puede purificar la enzima SLE\_62990 mediante la implementación de la técnica HPLC. Por otra parte, se generó un cebador SR004 que amplifica el gen *sle\_62990* e incorpora una secuencia codificante para un cola de poli-histidinas en el C-terminal de la enzima. Este

cebador puede ser utilizado para generar una construcción génica para sobre-expresar una variante de enzima SLE\_62990 que sea purificada fácilmente mediante una columna de afinidad. Con la enzima ya purificada, el paso siguiente sería la caracterización de la enzima SLE\_62990. En este punto sería conveniente contrastar los parámetros obtenidos de la caracterización de la enzima con los rangos de tolerancia propios de *S. leeuwenhoekii* C34, ya que se sabe que es una bacteria termotolerante, psicotolerante, halotolerante y alcalitolerante. Utilizando estos resultados se podría generar una aproximación de las características de otras enzimas extracelulares de este microorganismo.

## 5. CONCLUSIÓN.

A partir de los análisis bioinformáticos y experimentales realizados en este trabajo se puede concluir que las herramientas bioinformáticas y bases de datos de proteínas ofrecen información confiable que es de gran utilidad para el estudio de las enzimas putativas. Por otra parte, los resultados obtenidos mediante la sobreexpresión del gen *sle\_62990* en *S. leeuwenhoekii* C34 permitieron concluir que éste codifica para una lipasa extracelular funcional en *Streptomyces leeuwenhoekii* C34, la cual presenta actividad contra *p*-nitrofenil palmitato y que además posee una mayor temperatura óptima que el homólogo SCO7513 de *S. coelicolor* A(3). Finalmente, mediante la expresión de la enzima SLE\_62990 por dos metodologías diferentes se puede concluir que la expresión de la enzima activa es más eficaz en *S. leeuwenhoekii* que en la expresión heteróloga llevada a cabo en *E. coli*.Rosetta 2.

## 6. BIBLIOGRAFÍA.

Kühne, W. (1976). Über das Verhalten verschiedener organisirter und sog. ungeformter Fermente. *FEBS Letters*, 62, 4-7.

Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed research international*, 2013

Gandhi, N. N. (1997). Applications of lipase. *Journal of the American oil chemists' society*, 74, 621-634.

Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology advances*, 19, 627-662.

Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M. & Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 29–63.

Snellman, E. A., Sullivan, E. R., & Colwell, R. R. (2002). Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. *The FEBS Journal*, 269, 5771-5779.

Nagayama, M., (1989). New Developments of Textile Detergency by the Use of Enzymes. The Present Situation of the Application of Enzymes for Detergent. *Senshobu Kogyo*. °37:453–462

Kirchner, G., Scollar, M. P., & Klivanov, A. M. (1985). Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. *Journal of the American chemical society*, 107, 7072-7076.

Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial technology*, 39, 235-251.

Littlechild, J. A. (2015). Enzymes from extreme environments and their industrial applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3.161.

Van Lanen, S. G., & Shen, B. (2006). Microbial genomics for the improvement of natural product discovery. *Current opinion in microbiology*, 9, 252-260.

Horikoshi, K., & Bull, A. T. (2011). Prologue: definition, categories, distribution, origin and evolution, pioneering studies, and emerging fields of extremophiles. In *Extremophiles handbook* (pp. 3-15). Springer Japan.

Steele, H. L., Jaeger, K. E., Daniel, R., & Streit, W. R. (2009). Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenomes. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 16, 25-37.

Feller, G., & Gerday, C. (2003). Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nature reviews microbiology*, 1, 200-208.

Horikoshi, K. (1999). Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63, 735-750.

Karan, R., Capes, M. D., & DasSarma, S. (2012). Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. *Aquatic biosystems*, 8, 4.

Bull, A. T., Asenjo, J. A., Goodfellow, M., & Gómez-Silva, B. (2016). The Atacama Desert: technical resources and the growing importance of novel microbial diversity. *Annual review of microbiology*, 70, 215-234.

Navarro-González, R., Rainey, F. A., Molina, P., Bagaley, D. R., Hollen, B. J., de la Rosa, J., ... & Gomez-Silva, B. (2003). Mars-like soils in the Atacama Desert, Chile, and the dry limit of microbial life. *Science*, 302, 1018-1021.

Cordero, R. R., Seckmeyer, G., Damiani, A., Riechelmann, S., Rayas, J., Labbe, F., & Laroze, D. (2014). The world's highest levels of surface UV. *Photochemical & photobiological sciences*, 13, 70-81.

Dose, K., Bieger-Dose, A., Ernst, B., Feister, U., Gómez-Silva, B., Klein, A., ... & Stridde, C. (2001). Survival of microorganisms under the extreme conditions of the Atacama Desert. *Origins of life and evolution of biospheres*, 31, 287-303.

Okoro, C. K., Brown, R., Jones, A. L., Andrews, B. A., Asenjo, J. A., Goodfellow, M., & Bull, A. T. (2009). Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 95, 121-133.

Bull, A. T., & Asenjo, J. A. (2013). Microbiology of hyper-arid environments: recent insights from the Atacama Desert, Chile. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103, 1173-1179.

Lerat, S., SIMAO-BEAUNOIR, A. N. N. E., & Beaulieu, C. (2009). Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *Molecular plant pathology*, 10, 579-585

Goodfellow, M., & Williams, S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual reviews in microbiology*, 37, 189-216.

Bowers, K. J., & Wiegel, J. (2011). Temperature and pH optima of extremely halophilic archaea: a mini-review. *Extremophiles*, *15*(2), 119-128.

Busarakam, K., Bull, A. T., Girard, G., Labeda, D. P., van Wezel, G. P., & Goodfellow, M. (2014). *Streptomyces leeuwenhoekii* sp. nov., the producer of chaxalactins and chaxamycins, forms a distinct branch in *Streptomyces* gene trees. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *105*, 849-861

Sarrouh, B., Santos, T. M., Miyoshi, A., Dias, R., & Azevedo, V. (2012). Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. *Journal of bioprocessing & biotechniques* S, *4*, 002.

Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech* *6*: 174.

Côté, A., & Shareck, F. (2008). Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Enzyme and microbial technology*, *42*, 381-388

Wiseman, A. (1995). Introduction to principles. *Handbook of enzyme biotechnology*. 3rd ed. Padstow, Cornwall, UK: Ellis Horwood Ltd. TJ Press Ltd, 3-8.

McCarthy, A. J., & Williams, S. T. (1992). Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment—a review. *Gene*, *115*, 189-192.

Gomez-Escribano, J. P., Castro, J. F., Razmilic, V., Chandra, G., Andrews, B., Asenjo, J. A., & Bibb, M. J. (2015). The *Streptomyces leeuwenhoekii* genome: de novo sequencing and assembly in single contigs of the chromosome, circular plasmid pSLE1 and linear plasmid pSLE2. *BMC genomics*, *16*, 485.

Anné, J., Vrancken, K., Van Mellaert, L., Van Impe, J., & Bernaerts, K. (2014). Protein secretion biotechnology in Gram-positive bacteria with special emphasis on *Streptomyces lividans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular cell research*, *1843*, 1750-1761.

Plotkin, J. B., & Kudla, G. (2011). Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nature reviews genetics*, *12*, 32-42.

Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, *72*, 211.

Castro, J. F., Razmilic, V., Gomez-Escribano, J. P., Andrews, B., Asenjo, J. A., & Bibb, M. J. (2015). Identification and heterologous expression of the chaxamycin biosynthesis gene

cluster from *Streptomyces leeuwenhoekii*. *Applied and environmental microbiology*, *81*, 5820-5831.

Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Heuvel, M., & Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS microbiology reviews*, *15*, 29-63.

Rateb, M. E., Houssen, W. E., Arnold, M., Abdelrahman, M. H., Deng, H., Harrison, W. T., ... & Bull, A. T. (2011). Chaxamycins A–D, bioactive ansamycins from a hyper-arid desert *Streptomyces* sp. *Journal of natural products*, *74*, 1491-1499

UniProt Consortium. (2014). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic acids research*, *43*, D204-D212.

Hannig, G., & Makrides, S. C. (1998). Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends in biotechnology*, *16*, 54-60.

Gustafsson, C., Govindarajan, S., & Minshull, J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in biotechnology*, *22*, 346-353.

Mustranta, A. (1992). Use of lipases in the resolution of racemic ibuprofen. *Applied microbiology and biotechnology*, *38*(1), 61-66.