

Búsqueda de proteasas termoestables en una metagenoteca de aguas termales.

Búsqueda de proteasas termoestables nunha metaxenoteca de augas termais.

Search of thermostable proteases in a hot spring metagenomic library

Javier Sánchez Maggiora

Tutor:

Manuel Becerra Fernández

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA AVANZADA
CURSO 2015/2016



TRABAJO FIN DE MÁSTER

D. Manuel Becerra Fernández, como tutor académico del alumno **D. Javier Sánchez Maggiora**, estudiante del Máster en Biotecnología Avanzada, autoriza la presentación del Trabajo de Fin de Máster: *Búsqueda de proteasas termoestables en una metagenoteca de aguas termales*, para su defensa ante el tribunal calificador.

A Coruña, 1 de Julio de 2016

Fdo.: Manuel Becerra Fernández

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Enzimas termófilas en procesos industriales	1
1.2 Las proteasas en procesos industriales	2
1.3 Metagenómica	3
1.4 Etapas en la construcción de una metagenoteca	4
1.5 Aguas termales en Galicia	5
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS	6
3.1 Metagenoteca de Rio Caldo	6
3.2 Cepas bacterianas y vectores	6
3.3 Medios de cultivo	7
3.4 Sustrato fluorescente	7
3.5 Técnicas de manipulación del ADN	8
3.6 Preparación y transformación bacteriana	11
3.7 Cribado funcional	12
3.8 Ensayos de actividad proteasa	13
3.9 Secuenciación	13
3.10 Herramientas bioinformáticas	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
4.1 Resultados cribado funcional	14
4.2 Resultados subclonaciones	17
4.3 Resultados ensayos actividad proteasa	24
4.4 Resultados secuenciación	25
5. CONCLUSIONES	27
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Las enzimas termófilas en los procesos industriales*

El papel de las enzimas en muchos procesos se conoce desde hace mucho tiempo. Su uso se inició ya en la antigua Grecia, donde eran utilizadas, de manera empírica, sin una base científica, enzimas de microorganismos en la cocción, elaboración de la cerveza, la producción de alcohol, la fabricación de queso, etc.

Con el tiempo, el número de aplicaciones ha ido en aumento debido al cada vez mayor conocimiento y, con la disponibilidad de enzimas termoestables han surgido una serie de nuevas posibilidades para los procesos industriales.

Las enzimas termoestables son aisladas principalmente de organismos termófilos y poseen un gran número de aplicaciones comerciales debido a su estabilidad general inherente (Demirjian *et al.*, 2001). Los avances en esta área han sido posibles con el aislamiento de un gran número de microorganismos termófilos de diferentes ambientes y la posterior extracción de enzimas útiles de ellos (Burrows, 1973; Antranikian *et al.*, 1987; Groboillot, 1994; Bharat *et al.*, 1998; Bauer *et al.*, 1999; Kohilu *et al.*, 2001). Algunos ejemplos de enzimas termófilas se detallan en la tabla 1.

Mientras que las enzimas termoestables más utilizadas son las amilasas en la industria del almidón (Poonam *et al.*, 1995; Crab *et al.*, 1997; Emmanuel *et al.*, 2000; Sarikaya *et al.*, 2000), una serie de otras aplicaciones se encuentran en distintas etapas de desarrollo. En la industria alimentaria, han sido utilizadas en la síntesis de aminoácidos (Satosi *et al.*, 2001). En las industrias petrolera, papelera y química, se han empleado enzimas termoestables para la eliminación de contaminantes con contenido en azufre a través de la biodegradación de compuestos como dibenzotiofeno (Bahrami *et al.*, 2001), en la producción de 1, 3- propenodiol a partir de glicerol o en la sustitución de contaminantes que producen reactivos químico tóxicos (Peter *et al.*, 2001).

Sus propiedades tienen importantes implicaciones industriales y biotecnológicas debido al hecho de que las enzimas de estos microorganismos se pueden emplear para su uso en las duras condiciones industriales, ya que son capaces de retener su actividad catalítica específica.

Las ventajas de que estos procesos industriales se lleven a cabo a elevadas temperaturas son múltiples: reducir el riesgo de contaminación por organismos mesófilos comunes,

umentar la biodisponibilidad y solubilidad de compuestos orgánicos (Becker, 1997), permitir velocidades de reacción elevadas o alcanzar un mayor rendimiento del proceso (Mozhaev, 1993; Krahe *et al.*, 1996; Kumar *et al.*, 2001).

Source	Microorganism	Enzyme	References
Hot spring	<i>Thermus</i> sp.	α -Amylase	Shaw et al. (1995)
Hot spring	<i>Bacillus</i> sp. WN.11	α -Amylase	Mamo and Gessese (1999)
Deep sea hydrothermal vent	<i>Staphilothermus marinus</i>	α -Amylase	Canganella et al. (1994)
Marine solfatara	<i>Thermococcus litoralis</i>	Pullulanase	Brown and Kelly (1993)
Decomposed plant samples from a lake	<i>Clostridium absonum</i> CFR-702	Cellulase free xylanase	Swaroop and Krishna (2000)
Hot spring	<i>Bacillus thermoleovocans</i> ID-1	Lipase	Dong-Woo et al. (1999)
Compost of fermenting citrus peels, coffee and tea extract residues	<i>Bacillus strain</i> MH-1	Endochitinase	Kenji et al. (1998)
Compost	<i>Bacillus stearothermophilus</i> CH-4	β -N-acetylhexosaminidase	Kenji et al. (1994)
Korean salt fermented anchovy	<i>Bacillus</i> sp. KYJ963	β -Amylase	Young et al. (2001)
Deep sea hydrothermal vent	<i>Pyrococcus abyssi</i>	Alkaline phosphatase	Sebastien et al. (2001)
Sediments of hot springs	<i>Bacillus</i> sp. 3183	α -Amylase-like pullulanase	Badal et al. (1989)
Garbage dump	<i>Bacillus circulans</i>	Xylanase	Ashita et al. (2000)
Compost treated with artichoke juice	<i>Bacillus</i> sp.	Inulinase	Jean-Jacques et al. (1987)

Tabla 1. Microorganismos fuente de enzimas termófilas (Haki & Rakshit, 2003)

1.2 Las proteasas en procesos industriales

Las proteasas (o enzimas proteolíticas) catalizan la degradación de proteínas hidrolizando sus enlaces peptídicos dando lugar a aminoácidos y péptidos. Las proteasas, generalmente se clasifican en dos categorías (exopeptidasas, que escinden enlaces peptídicos de los extremos de la cadena y endopeptidasas, que escinden enlaces peptídicos en el interior de la cadena). También pueden clasificarse según la naturaleza de su sitio catalítico.

La cantidad de enzimas proteolíticas producidas en el mundo que poseen interés industrial es mayor que cualquier otro grupo de enzimas. Algunas proteasas alcalinas son usadas en la elaboración de detergentes por su capacidad de resistir condiciones alcalinas y desnaturalizantes, en la industria del cuero, la industria farmacéutica o alimentaria (Cowan. 1996; Fan *et al.*, 2001. Mozersky *et al.*, 2002). La exploración de proteasas que pueden catalizar reacciones bajo condiciones extremas son válidas para aplicaciones industriales (Ladenstein *et al.*, 1998).

Una gran variedad de proteasas estables al calor han sido identificadas en arqueas hipertermófilas pertenecientes a los géneros *Desulfurococcus*, *Sulfolobus*, *Staphylothermus*, *Thermococcus*, *Pyrobaculum* y *Pyrococcus*.

Existe un considerable interés actual en la exploración de proteasas que pueden catalizar reacciones en agua fría (Demirjian *et al.*, 2001). Esto permitirá su uso en detergentes que se pueden usar en el agua del grifo normal sin la necesidad de aumentar la temperatura del agua. La búsqueda de tales enzimas es en gran medida un desafío en este momento.

Las aplicaciones seguirán creciendo en el futuro, al igual que la necesidad de biocatalizadores estables capaces de soportar las duras condiciones de algunas operaciones industriales.

1.3 *Metagenómica*

La metagenómica es una disciplina que permite el estudio del conjunto de genomas de una comunidad microbiana prescindiendo de la etapa de cultivo. Por lo tanto, es una vía de estudio para aquellos microorganismos que no pueden ser cultivados (Amann *et al.*, 1995). Las técnicas metagenómicas se pueden aplicar a una gran diversidad de ambientes, incluyendo el suelo, la cavidad oral, las heces o los hábitats acuáticos.

Esta comunidad de ADN, metagenoma o librería de ADN, puede ser posteriormente estudiada siguiendo dos estrategias, un enfoque funcional en el que se rastrea la expresión de un gen de interés en la célula hospedadora (metagenómica funcional) o un enfoque basado en secuencia, que incluye secuenciaciones de alto rendimiento (metagenómica basada en secuencia).

De esta manera, estas librerías permiten la búsqueda de moléculas presentes en los microorganismos, abriendo nuevas posibilidades para el desarrollo de nuevos productos (Fernández-Arrojo *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2008; Uchiyama *et al.*, 2009; Warnecke *et al.*, 2007) o el estudio de genes, rutas o relaciones filogenéticas.

Mediante metagenómica funcional se han conseguido identificar enzimas como quitinasas (Cottrell *et al.*, 1999), 4-hidroxiacetato dehidrogenasas (Henne *et al.*, 1999), lipasas y esterasas (Henne *et al.*, 2000; Rondon *et al.*, 2000; Voget *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Rhee *et al.*, 2005), amilasas (Rondon *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 2002; Gabor *et al.*, 2003; Yun *et al.*, 2004), proteasas (Gupta *et al.*, 2002), β -glucosidasas y β -lactamasas (Gabor *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2005), amidasas (Gabor *et al.*, 2004b), nitrilasas

(Robertson *et al.*, 2004) y liasas (Solbak *et al.*, 2005). Algunas de las enzimas identificadas mediante metagenómica y sus aplicaciones están recogidas en la Tabla 2.

Product	Application ^a	Manufacturer ^b	Number of patents ^c
Cellulase	Textile industry, plant biotechnology	Syngenta Mogen B.V. Gist-Brocades N.V. Roche Vitamins Inc	4,735 ^d
Lipase	Cleaning industry, academic	Genecor	6,649 ^e
Protease	Alkaline tolerant	Sinobis	10,000 ^f
Amylase	Food industry	BASF	5,208 ^e
Chitinase	Pharmaceuticals, food industry, bioremediation, biomedicine	Sukahon Biotechnology	876 ^d
Fluorescent protein	Biometabolites, pharmaceutical industry for drug discovery	Diversa	10,000 ^g
Antibiotics	Medicine	Libragen, Kosan Technologies	10,000 ^h
Xylanase	Paper and textile industry	Huzhou Lilly biology Technology Co. Ltd	1,321 ^d

Tabla 2. Ejemplos de compuestos descubiertos por metagenómica y sus aplicaciones (Ekkers *et al.*, 2012)

1.4 Etapas en la construcción de una metagenoteca

Generalmente para la construcción de una metagenoteca se siguen los siguientes pasos (Figura 1):

- 1) Aislamiento del ADN de la muestra medioambiental: Por extracción directa del ADN. Esta es una mezcla del material genético de todos los organismos presentes en la muestra.
- 2) Clonación del ADN en un vector adecuado: El vector se selecciona en función del fragmento que queremos insertar. Para pequeños fragmentos, plásmidos <15 kb, para grandes fragmentos cósmidos (15-40 kb), fósmidos (25-45 kb) o cromosomas bacterianos artificiales (BACs) (100-200 kb) (Angelov *et al.*, 2009; Kakirde *et al.*, 2011; Uchiyama *et al.*, 2009; Van Elsas *et al.*, 2008).
- 3) Transformación de los clones en una cepa bacteriana huésped: Es habitual utilizar *Escherichia coli* como huésped por su conocimiento, rápido crecimiento y facilidad de manejo.
- 4) Cribado de las colonias transformadas: Según una determinada actividad presente (cribado funcional) o secuenciando estos clones (cribado basado en secuencia).

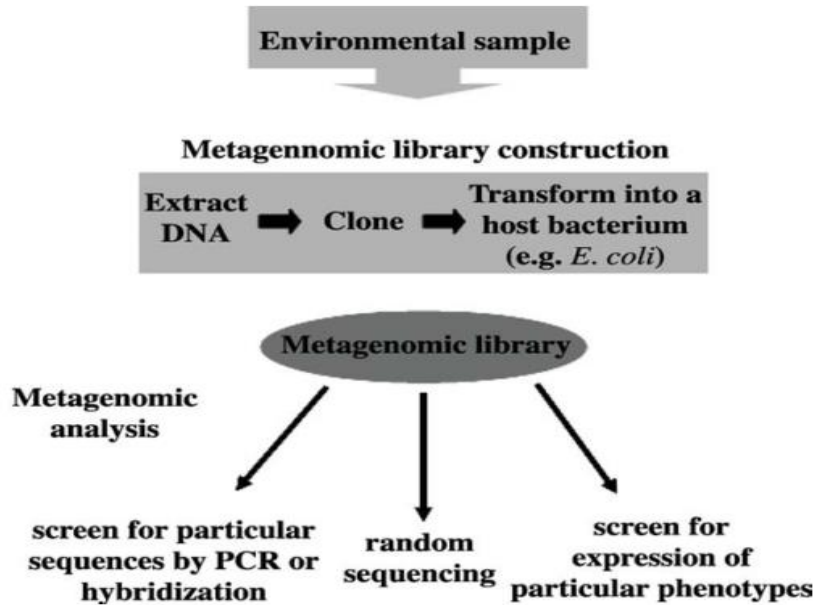


Figura 1. Etapas en la metagenómica (Reisenfeld *et al.*, 2004)

1.5 Las aguas termales en Galicia

Galicia es una de las comunidades autónomas del territorio español más ricas en aguas minero-medicinales, tanto en cantidad como en diversidad de tipos.

Las aguas minerales de Galicia son de origen exógeno o meteórico, es decir proceden de la infiltración de aguas de lluvia, que en su recorrido subterráneo pueden alcanzar una importante temperatura y sobre todo adquirir sus componentes químicos, debido a reaccionar y disolver los diferentes materiales con los que ha tenido contacto.

La circulación de las aguas infiltradas se realiza generalmente a favor de grandes fracturas, que permiten su penetración en el subsuelo por simple efecto de la gravedad. El flujo descendente en el área de recarga, situada en las zonas altas de las montañas, se dirige hacia arriba en el área de descarga, emplazada en el fondo de los valles. Las aguas infiltradas experimentan en su descenso un aumento de su temperatura, debido al gradiente geotérmico, y una mayor presión debido a la columna de la propia agua que tiene encima.

Los microorganismos que habitan los manantiales geotermales gallegos constituyen una población adecuada, todavía mayoritariamente inexplorada, dada su imposibilidad de cultivarlos en las condiciones habituales de laboratorio, para la búsqueda de enzimas termoestables y robustas para las aplicaciones industriales demandadas.

2. OBJETIVOS

Los principales objetivos del trabajo son:

- 1) Búsqueda de proteasas termoestables en una metagenoteca de aguas termales gallega
- 2) Subclonación del gen o genes obtenidos en un vector de expresión adecuado
- 3) Secuenciación y búsqueda en las bases de datos de la proteína o proteínas con actividad proteasa obtenido

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 *Metagenoteca de Río Caldo*

Para la realización de este trabajo se partió de una metagenoteca de aguas del manantial geotermal de Río Caldo (Lobios, Ourense) previamente disponible en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la UDC (López-López *et al.*, 2015). Este manantial presenta una temperatura de surgencia de 76°C y un pH de 8,2. La extracción de ADN, a partir de 25 L de las aguas del manantial, se realizó empleando el kit comercial *Metagenomic DNA isolation kit for water* (Epicentre Biotechnologies), basado en un método químico y enzimático para la extracción de ADN con alto peso molecular, con roturas aleatorias que dan lugar mayoritariamente a fragmentos de aproximadamente 40kb. Para construir la metagenoteca procedente de Río Caldo se emplearon componentes y procedimientos del kit comercial *CopyControl fosmid library production kit* (Epicentre Biotechnologies), pero utilizando el fósido pCT3FK, cedido amablemente por su autor, el Dr. A. Angelov (Angelov *et al.*, 2009). Este fósido es un vector lanzadera *Escherichia coli/Thermus thermophilus*, y está basado en el fósido comercial pCC1FOS. Contiene un origen de replicación de copia única y es inducible a alto número de copias. Confiere resistencia a cloranfenicol y contiene un casete de resistencia a kanamicina termoestable. Los clones fueron transferidos a placas de 96 pocillos (aproximadamente unos 100 clones por pocillo en 1 placa en total) para conservarlos como un *stock* en glicerol.

3.2 *Cepas bacterianas y vectores.*

Para la expresión de la secuencia clonada que presentaba actividad proteasa, se utilizó el plásmido de expresión pJET 1.2 del kit comercial *CloneJET PCR Cloning Kit*

(*ThermoFisher Scientific*) marcado con resistencia a ampicilina y se transformó inicialmente en la cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue {*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr)]*} (*Stratagene*) y posteriormente en la cepa de *E. coli* DH10B {*F' araDJ39 Δ(ara, leu)7697 AlacX74 galU galK rpsL deoR 48OdlacZ Δ M15 endA1 nupG recA1 mcrA Δ (mrr hsdRMS mcrBC)*} que permitió obtener mejores resultados en la transformación en cuanto a eficiencia.

3.3 Medios de cultivo

El medio de cultivo utilizado para la cepa *E. coli* fue el medio LB (Luria-Bertani). La composición de este medio es: 1% de bacto triptona, 0.5% de NaCl y 0.5 % de extracto de levadura.

Los medios de cultivo líquidos se prepararon disolviendo los componentes en agua destilada. Para los medios sólidos se añadió adicionalmente agar bacteriológico al 1.5 % como agente solidificante. La esterilización se realizó en un autoclave a 121 °C y 2 Ba de presión durante 20 minutos.

El medio LB-cloranfenicol es un medio selectivo que se empleó para el cultivo de bacterias portadoras del plásmido pCT3FK, portadoras del marcador Chl^{R} de resistencia al cloranfenicol. La composición es idéntica al medio LB pero suplementado con cloranfenicol a una concentración final de 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El cloranfenicol está preparado a partir de un stock de 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y es disuelto en etanol. En un cultivo inicial y en medio líquido, también se añade arabinosa como agente inductor del vector a multicopia. Tanto el antibiótico como la arabinosa se añaden una vez esterilizado el medio, con el fin de que no se degraden.

El medio LB-ampicilina se empleó para el cultivo de bacterias transformadas con el plásmido de expresión pJET 1.2, portadoras del marcador Amp^{R} de resistencia a ampicilina. Es medio LB suplementado con 40-80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina (a partir de una disolución stock de 40 mg/ml en agua estéril). El antibiótico se añadió una vez esterilizado el medio, tras alcanzar una temperatura de 60-65°C.

3.4 Sustrato fluorescente

La búsqueda funcional de la actividad proteasa en la metagenoteca se realizó mediante la detección de la fluorescencia emitida al incubar el cultivo en presencia del sustrato

fluorescente contenido en el kit comercial *EnzChek® Protease Assay Kits E6638 Molecular Probes* (Invitrogen detection technologies de Thermo Fisher Scientific®). Es un ensayo rápido, sencillo y de fluorescencia directa para la detección de la actividad de distintas clases de proteasas a muy bajos niveles.

El kit contiene derivados de caseína fuertemente marcados con el colorante verde fluorescente BODIPY® FL (E6638). Este conjugado formado sirve para extinguir la fluorescencia. Al incubarlo con una proteasa, esta cataliza la hidrólisis y libera la molécula fluorescente, que ya es capaz de emitir fluorescencia (Figura 2). La fluorescencia fue medida en el espectrofluorímetro *Synergy HI hybrid Reader* (Biotek®), que posee un lector de microplacas, y es proporcional a la actividad proteasa presente.

Más información disponible desde la página web de la casa comercial (<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp06638.pdf>).

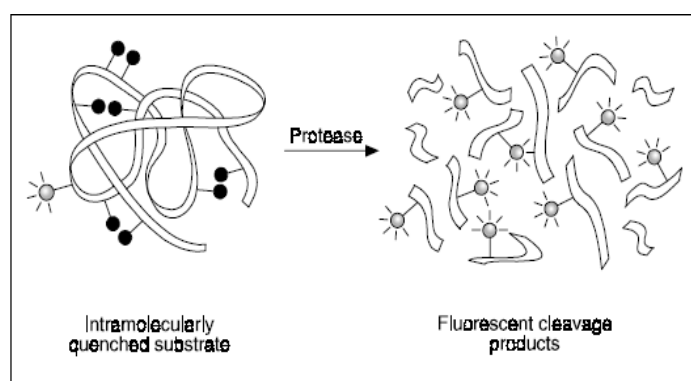


Figura 2. Principio de la detección de actividad proteasa con *EnzCheck Protease Assay Kit* (figura extraída del manual de la casa comercial)

3.5 Técnicas de manipulación de ADN

3.5.1 Extracción del ADN plasmídico

La extracción del ADN plasmídico de un cultivo recombinante de *E. coli* se realizó utilizando kit comercial *GeneJET Miniprep* (ThermoFisher Scientific®). Este kit utiliza una tecnología basada en una membrana de sílica en una columna de espín. Así permite separar hasta 20 ng de ADN plasmídico con un alto grado de pureza. Además es un método rápido, de bajo coste y efectivo. El rendimiento del proceso depende del número de copias del plásmido y del medio utilizado en el cultivo.

El primer paso para llevar a cabo la extracción es pasar a una alícuota un volumen de células recombinantes cultivadas en medio líquido y centrifugarlas a 8000 rpm durante dos minutos. Este pellet será el que se resuspenda en 250 µL de solución de resuspensión con ayuda de un vortex.

Posteriormente, se añadieron 250 µL de tampón de lisis para romper la célula por lisis alcalina y se invirtió el tubo 4-6 veces. Esta solución también promueve la desnaturalización del ADN. Luego se añadieron 350 µL de solución de neutralización y se mezcló por inversión 4-6 veces o por vortex. Con esta solución, el ADN genómico se aparea formando agregados que precipitan, mientras que el ADN plasmídico permanece soluble. Posteriormente, este lisado celular se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante fue transferido a una de las columnas proporcionadas con el kit y se volvió a centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto. Se añadieron 500 µL de la solución de lavado con etanol, se centrifugó 1 minuto a 13000 rpm y se volvió a repetir este paso, para eliminar el etanol restante. Por último, se transfirió la columna a un tubo Eppendorf y se añadieron 50 µL de agua destilada, dado el tamaño del plásmido, para eluir el plásmido de ADN.

Este protocolo también puede verse desde la página web de la casa comercial (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012655_GeneJET_Plasmid_Miniprep_UG.pdf)

Otro kit comercial que también fue usado para la extracción del ADN plasmídico fue *Fosmid MAXTM DNA purification kit (Epicentre®)*. Una de las ventajas de este kit frente al kit de miniprep es que permite mayores extracciones de ADN para fósmidos, plásmidos de gran tamaño, al no utilizar columnas ni resinas. Sin embargo, entre sus inconvenientes están el uso de diversos tipos de alcohol, que pueden interferir con futuras medidas del ADN, o el largo protocolo. El protocolo puede verse en la página web de la casa comercial (<http://www.epibio.com/docs/default-source/protocols/FosmidMAX-DNA-Purification-Kit.pdf>) y se basa en los mismos principios que el kit de miniprep.

3.5.2 Métodos de análisis del ADN

Las cuantificaciones de ADN se realizaron con un espectrofotómetro *BioSpectrometer (Eppendorf)*. Se utilizaron 2 µL de muestra para las mediciones y el protocolo de medición de ADN de doble cadena incluido en el programa. Este programa, además de

proporcionarnos información sobre la concentración de nuestra muestra por su absorción a 260 nm, también lo hace de su grado de pureza, mediante la relación A_{260}/A_{280} . La relación ideal se ajusta a un valor aproximado de 1,8 (Sambrook *et al.*, 1989).

Tras la espectrofotometría, se realizaron electroforesis en gel de agarosa, tanto para medir el tamaño en pares de bases (bp) de la molécula de ADN extraída como para el análisis de los productos de digestión con enzimas de restricción de los plásmidos.

Los geles de agarosa, habitualmente al 1% o 0,7%, se prepararon utilizando el tampón TAE (Tris 40 mM, ác. Acético 19 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5). Las electroforesis se realizaron utilizando voltajes entre 45 y 65 V y habitualmente se dejaron correr 4 horas y media. El marcador de pesos moleculares utilizado fue *GeneRuler 1 Kb* y *GeneRuler High range* (Thermo Fisher Scientific®) para moléculas de mayor tamaño. El intercalante de ADN usado fue *Gel Green* (Biotium), en un volumen de 1 μ L cada 4 μ L de muestra y marcador.

3.5.3 Digestión del ADN

Se digirió el ADN extraído de un clon positivo en actividad proteasa mediante una enzima de restricción. Las digestiones de ADN se realizaron utilizando los tampones suministrados por la casa comercial, a la temperatura recomendada y en los volúmenes recomendados. Al finalizar la digestión, las enzimas fueron desactivadas por calor según las recomendaciones del proveedor.

Como la secuencia del inserto de ADN en el plásmido pCT3FK es desconocida y no sabemos el gen que codifica la actividad proteasa, se realizaron digestiones con distintas enzimas con el fin de conseguir un fragmento en el que observar actividad tras la subclonación en pJET 1.2. Posteriormente, la comprobación de la digestión se hizo mediante una electroforesis en gel de agarosa.

En la siguiente tabla (Tabla 3), se puede ver las dos enzimas utilizadas, así como algunas de sus características:

	Secuencia diana	T° actividad	T° inactivación	Casa comercial
Eco RV	GAT//ATC	37 °C	80 °C	Roche Life Science®
Sma I	CCC/GGG	30 °C	65 °C	Takara ®

Tabla 3. Las tres enzimas de restricción utilizadas

3.5.4 Recuperación de bandas de ADN en gel de agarosa.

Una vez revelado el gel de electroforesis de las digestiones con las distintas enzimas se recupera la banda más pequeña, correspondiente al fragmento de menor tamaño de ADN, mediante el kit comercial *GeneJET Gel Extraction* (Thermo Fisher Scientific®), con el fin de poder realizar la ligación al plásmido de expresión, pJET 1.2. El protocolo seguido es el recomendado por la casa comercial (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012661_GeneJET_Gel_Extracti_on_UG.pdf).

3.5.5 Ligamiento

Para el ligamiento de los fragmentos obtenidos en la digestión con el plásmido pJET 1.2 se empleó el kit comercial *CloneJET cloning kit* (Thermo Fisher Scientific®), que utiliza la enzima *T4* ligasa para llevar a cabo esta ligación. El volumen final de la reacción recomendado por el proveedor son 20 μL , que incluyen 1 μL del plásmido pJET 1.2, 1 μL de la enzima *T4* ligasa, 10 μL del *Buffer* suministrado en el kit, la cantidad de ADN necesaria para tener 0,15 pmol y un volumen de agua hasta completar el volumen final de reacción.

3.6 Preparación y transformación de bacterias.

Con la finalidad de poder introducir material genético en células bacterianas es necesario inducir un estado de competencia en las células bacterianas, durante el cual son capaces de captar ADN. Este estado de competencia es inducido mediante un tratamiento con sales y, posteriormente, un choque térmico, para permeabilizar la membrana. En este caso, la competencia se ha inducido previamente por tratamiento en presencia de CaCl_2 y una vez preparadas las células competentes son almacenadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento de su utilización.

Para la transformación de las células competentes *E. coli* XL1 Blue, se tomó una alícuota del almacén a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ y se reposaron 15 minutos en hielo. Posteriormente, se agregó 0.5-1 μL del plásmido pJET1.2 con nuestro inserto, se puso 30 minutos en hielo, un minuto y medio a $42\text{ }^\circ\text{C}$ y un minuto al hielo, tras lo cual se añadieron 900 μL de medio LB líquido estéril y se incubó 30 minutos a $37\text{ }^\circ\text{C}$ en agitación. Por último, se realizó una centrifugación a 8000 rpm durante 2 minutos y se descartaron 800 μL del sobrenadante,

tras lo que se resuspendieron las células y se sembraron 200 μL en placas con medio LB-ampicilina (LBA), ya que este vector confiere resistencia a ampicilina.

En el caso de la transformación de las células *E. coli* DH10B con el vector de pJET 1.2 con el inserto, se sigue el mismo tratamiento.

3.7 Cribado funcional

3.7.1 *Búsqueda funcional de la actividad proteasa en la metagenoteca.*

Inicialmente se inocularon 10 μL de cada uno de los pocillos de la placa de 96 pocillos que contenía la metagenoteca, en una placa estéril de 96 pocillos, que contiene en cada pocillo 100 μL de medio LB, suplementado con cloranfenicol y arabinosa. Estas colonias fueron incubadas a 37 °C en agitación durante toda la noche.

Tras esta incubación, y con el fin de comprobar la presencia de actividad, se centrifugó la placa 1 minuto a 3000 rpm para obtener un precipitado celular y un sobrenadante donde está presente la actividad.

Se incubó 10 μL del sobrenadante en una placa *round bottom black* de 384 pocillos (*Corning*), placa oscura para detectar fluorescencia, con 10 μL de sustrato fluorescente, durante una hora en oscuridad. Posteriormente se realizó la lectura de la fluorescencia.

Con el fin de seleccionar pocillos positivos, se adoptó un criterio que nos permitiese distinguir resultados positivos de negativos. El criterio utilizado fue el que se emplea en el artículo de Nyysönen (Nyysönen *et al.*, 2013), ya que el tipo de ensayo que utiliza es similar al usado por nosotros.

Tal criterio consiste en tomar como valores positivos las medidas de fluorescencia superiores a un valor umbral. El valor umbral es dos desviaciones estándar (o desviación típica) por encima del valor medio de todos los pocillos de una misma placa.

3.7.2 *Búsqueda funcional de actividad en pocillos positivos*

Se realizaron diluciones seriadas con 10 μL del pocillo positivo y se sembró en placa petri con medio sólido, con el objetivo de obtener colonias aisladas con actividad proteasa. Tras la incubación de esta placa a 37 °C en agitación durante toda la noche, se picaron colonias aisladas con un palillo de madera estéril y se inocularon en una placa estéril de 96 pocillos

con 100 μ L de medio LB y cloranfenicol, que se incubó a 37 °C en agitación durante toda la noche. Posteriormente, se siguió el mismo protocolo para detectar la fluorescencia.

La búsqueda funcional de actividad en las bacterias subclonadas se realizó de la misma manera.

3.8 Ensayos de actividad proteasa a distintas temperaturas

Tras detectar un positivo para actividad proteasa en la placa, se realizan ensayos a diferentes temperaturas. Para ello, se resuspendieron y se cultivaron 10 μ L del pocillo positivo en 1 mL de LB líquido con el antibiótico correspondiente a 37 °C durante toda la noche. A la mañana siguiente, se prepararon dos alícuotas de muestra para cada temperatura de ensayo (37°C y 70°C) que contenían 100 μ L del cultivo y 100 μ L del sustrato fluorescente (previamente incubado 10 minutos a su temperatura) y una alícuota control por temperatura con 100 μ L de medio LB sin cultivo y 100 μ L de sustrato fluorescente (previamente incubado 10 minutos a su temperatura) y se incubaron a las temperaturas ensayadas durante una hora. Las alícuotas se mantuvieron tapadas en todo momento, con el fin de evitar la degradación del sustrato.

Transcurrida la hora de incubación, el contenido de cada alícuota fue transferido a una placa *round bottom black* y se midió su fluorescencia. La media de los valores obtenidos para las alícuotas control (medio de cultivo sin inóculo) para cada una de las temperaturas determinadas fueron restadas a los valores obtenidos para la muestra.

3.9 Secuenciación

Para la secuenciación del ADN se contó con los servicios de secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del SAI (Servicios de Apoyo a la Investigación) de la Universidad de A Coruña. Se utilizaron los siguientes cebadores incluidos en el kit comercial *CloneJET cloning kit* (Thermo Fisher Scientific®):

- Secuenciación directa: 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'
- Secuenciación inversa: 5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'

3.10 Herramientas bioinformáticas

Una vez obtenida la secuencia, se empleó el programa BLAST del NCBI para la búsqueda de posibles proteínas homologas existentes en otros microorganismos.

En concreto se utilizó el programa BLASTx, que realiza una comparación en la base de datos de proteínas a partir de la información de secuencia de nucleótidos del ADN. El algoritmo utiliza los 6 posibles marcos de lectura y traduce los codones para realizar esa búsqueda, haciendo un alineamiento con secuencias similares de otros microorganismos encontrados en las bases de datos.

El resultado de cada uno de los alineamientos se indica en el *Query Cover* (porcentaje de la secuencia problema cubierto por el alineamiento de la secuencia encontrada) y el *Ident* (porcentaje de coincidencia o identidad en ese alineamiento).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados cribado funcional

4.1.1 Cribado funcional en metagenoteca de Río Caldo

Para la búsqueda funcional de actividad proteasa en la metagenoteca de Río Caldo se siguió el procedimiento descrito en materiales y métodos. En la Tabla 3 se recogen los resultados de la lectura de la fluorescencia emitida en cada uno de los 96 pocillos cultivados con la metagenoteca al completo incubada en placa *round bottom black*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	42131	37802	36506	33903	36197	36650	31891	34112	30345	33086	34694	33772
B	43537	30857	36946	34887	34257	36029	32098	34220	31593	31223	33070	30950
C	42094	31877	89543	35480	33283	34634	33301	33433	32401	33848	35097	32102
D	39323	34912	31027	33278	33984	30663	32763	43499	34600	33717	37116	31304
E	34679	33695	30500	33640	34901	33745	33996	35308	33174	31955	33883	27184
F	39514	34197	37153	36108	32380	34763	35274	35492	30846	36599	37920	27621
G	45022	34226	33545	35170	33987	34368	30687	34762	33264	35473	36215	34800
H	42170	37977	34250	34888	38293	36075	39941	37713	34817	37755	39404	28384

Tabla 3. Medida en unidades relativas de fluorescencia (URF) de la metagenoteca de Río Caldo

Según el criterio utilizado (Nyssönen *et al.*, 2013), con la media y la desviación típica de los datos (excluyendo el pocillo control, H12), calculamos:

Valor fluorescencia pocillo – Media – (2*Desv. Típica)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-6207,11837	-10536,1184	-11832,1184	-14435,1184	-12141,1184	-11688,1184	-16447,1184	-14226,1184	-17993,1184	-15252,1184	-13644,1184	-14566,1184
B	-4801,11837	-17481,1184	-11392,1184	-13451,1184	-14081,1184	-12309,1184	-16240,1184	-14118,1184	-16745,1184	-17115,1184	-15268,1184	-17388,1184
C	-6244,11837	-16461,1184	41204,8816	-12858,1184	-15055,1184	-13704,1184	-15037,1184	-14905,1184	-15937,1184	-14490,1184	-13241,1184	-16236,1184
D	-9015,11837	-13426,1184	-17311,1184	-15060,1184	-14354,1184	-17675,1184	-15575,1184	-4839,11837	-13738,1184	-14621,1184	-11222,1184	-17034,1184
E	-13659,1184	-14643,1184	-17838,1184	-14698,1184	-13437,1184	-14593,1184	-14342,1184	-13030,1184	-15164,1184	-16383,1184	-14455,1184	-21154,1184
F	-8824,11837	-14141,1184	-11185,1184	-12230,1184	-15958,1184	-13575,1184	-13064,1184	-12846,1184	-17492,1184	-11739,1184	-10418,1184	-20717,1184
G	-3316,11837	-14112,1184	-14793,1184	-13168,1184	-14351,1184	-13970,1184	-17651,1184	-13576,1184	-15074,1184	-12865,1184	-12123,1184	-13538,1184
H	-6168,11837	-10361,1184	-14088,1184	-13450,1184	-10045,1184	-12263,1184	-8397,11837	-10625,1184	-13521,1184	-10583,1184	-8934,11837	

Tabla 4. Resultados positivos en la placa de la Tabla 3

Así siguiendo este criterio, podemos considerar positivo el pocillo C3 (Tabla 4).

Se le añadieron 20 μL de glicerol a este pocillo positivo para su conservación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.2 Cribado funcional del pocillo C3

Se tomaron 10 μL del pocillo C3, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en placa Petri LB cloranfenicol, dando como resultado 45 unidades formadoras de colonias (UFCs) con la dilución 10^5 .

Cada una de estas UFCs fue cultivada en placa de 96 pocillos con el medio suplementado correspondiente. Tras la incubación y su paso a la placa *Round Bottom Black* con el sustrato, según el protocolo descrito, se obtuvo la siguiente tabla (Tabla 5) que recoge los resultados de lectura de fluorescencia en estos pocillos.

	1	2	3	4	5	6
A	25435	25269	24599	24954	23726	22913
B	24557	28544	25375	23818	22979	22783
C	26078	27084	26119	26507	23039	23879
D	26345	18926	25101	24096	23612	23667
E	25952	21526	25363	25557	24159	25402
F	26841	27797	26023	22443	23858	23213
G	28270	25767	25676	26026	24835	23076
H	28347	28643	26628	26839	25143	24333

Tabla 5. Primera medida en unidades relativas de fluorescencia (URF) del pocillo C3

Como solamente los 45 primeros pocillos contienen cultivo, se le aplicó la fórmula mencionada anteriormente [Valor fluorescencia pocillo – Media – (2*Desv. Típica)], obteniéndose los resultados de la Tabla 6.

	1	2	3	4	5	6
A	-3549,8667	-3715,8667	-4385,8667	-4030,8667	-5258,8667	-6071,8667
B	-4427,8667	-440,866698	-3609,8667	-5166,8667	-6005,8667	-6201,8667
C	-2906,8667	-1900,8667	-2865,8667	-2477,8667	-5945,8667	-5105,8667
D	-2639,8667	-10058,8667	-3883,8667	-4888,8667	-5372,8667	-5317,8667
E	-3032,8667	-7458,8667	-3621,8667	-3427,8667	-4825,8667	-3582,8667
F	-2143,8667	-1187,8667	-2961,8667	-6541,8667	-5126,8667	
G	-714,866698	-3217,8667	-3308,8667	-2958,8667	-4149,8667	
H	-637,866698	-341,866698	-2356,8667	-2145,8667	-3841,8667	

Tabla 6. Resultados positivos en la placa de la Tabla 5

Dado que con el criterio seguido, no se observa ningún pocillo positivo, se procedió a realizar nuevamente este protocolo. En este caso, se obtuvieron suficientes UFCs para cultivar la placa al completo. Los resultados se expresan a continuación (Tabla 7):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	31556	23975	25887	27708	24687	24413	27156	27368	27549	24637	26494	29401
B	29434	21159	22210	25928	26002	24725	27228	25262	26917	25105	27110	26148
C	25961	22556	26437	27071	25425	25674	27193	24360	35075	24686	26499	24830
D	27326	24717	23918	26853	23847	24774	28557	23986	36505	23115	24743	26057
E	24602	26789	29294	23184	23895	26736	27130	22104	32621	24715	24806	25383
F	27931	26127	27018	25100	21774	23782	27251	31417	29902	22769	23886	26170
G	28324	28928	26544	25927	24851	24635	28863	32401	34590	24934	22946	24841
H	30079	30040	26341	24986	24268	25249	29009	33760	27476	25515	25260	26371

Tabla 7. Segunda medida en unidades relativas de fluorescencia del pocillo C3

Así, con el criterio especificado anteriormente, podemos tomar como positivo 6 pocillos: G8, H8, C9, D9, E9 y G9 (Tabla 8).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-685,318817	-8266,31882	-6354,31882	-4533,31882	-7554,31882	-7828,31882	-5085,31882	-4873,31882	-4692,31882	-7604,31882	-5747,31882	-2840,31882
B	-2807,31882	-11082,3188	-10031,3188	-6313,31882	-6239,31882	-7516,31882	-5013,31882	-6979,31882	-5324,31882	-7136,31882	-5131,31882	-6093,31882
C	-6280,31882	-9685,31882	-5804,31882	-5170,31882	-6816,31882	-6567,31882	-5048,31882	-7881,31882	2833,68118	-7555,31882	-5742,31882	-7411,31882
D	-4915,31882	-7524,31882	-8323,31882	-5388,31882	-8394,31882	-7467,31882	-3684,31882	-8255,31882	4263,68118	-9126,31882	-7498,31882	-6184,31882
E	-7639,31882	-5452,31882	-2947,31882	-9057,31882	-8346,31882	-5505,31882	-5111,31882	-10137,3188	379,681183	-7526,31882	-7435,31882	-6858,31882
F	-4310,31882	-6114,31882	-5223,31882	-7141,31882	-10467,3188	-8459,31882	-4990,31882	-824,318817	-2339,31882	-9472,31882	-8355,31882	-6071,31882
G	-3917,31882	-3313,31882	-5697,31882	-6314,31882	-7390,31882	-7606,31882	-3378,31882	159,681183	2348,68118	-7307,31882	-9295,31882	-7400,31882
H	-2162,31882	-2201,31882	-5900,31882	-7255,31882	-7973,31882	-6992,31882	-3232,31882	1518,68118	-4765,31882	-6726,31882	-6981,31882	

Tabla 8. Resultados positivos en la placa de la Tabla 7

A partir del pocillo positivo C9, ya que con el pocillo D9 no fue posible realizar pruebas, se inoculó un tubo de 4 mL para extracción del ADN plasmídico mediante Miniprep.

4.2 Resultados de las subclonaciones de ADN.

Se inocularon 10 μ L del pocillo positivo C9 en 4 mL de medio LB-cloranfenicol para realizar una extracción del ADN plasmídico mediante el kit *GeneJET Miniprep* (*ThermoFisher Scientific*®), siguiendo el protocolo que se indica en el punto 3.5.1 (página 8-9). Previamente a la extracción, se realizó una centrifugación a 5000 rpm durante 2 minutos.

Una vez realizada la extracción, la medida de la concentración en el espectrofotómetro del ADN fue de 41,9 ng/ μ L. En la Figura 3, se presenta la electroforesis en gel de agarosa 1% de este ADN.

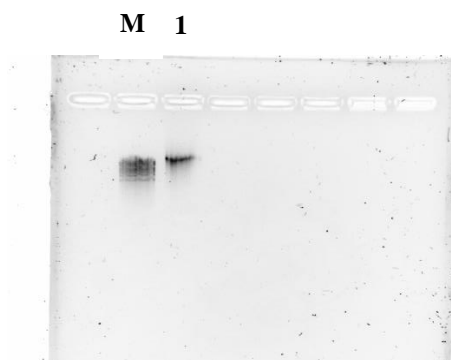


Figura 3. M: Generuler 1 Kb (2 μ L + 0.5 μ L Gel green). 1: ADN (2 μ L + 0.5 μ L Gel green)

Este ADN fue digerido con la enzima *Eco RV* (*Roche Life Science*®), cuyas características pueden verse en la Tabla 3 (página 10), siguiendo la siguiente reacción (Tabla 9):

	Volumen (μ L)
ADN	21,5
Buffer B (10X)	2,5
<i>Eco RV</i> (dilución 1/10)	1

Tabla 9. Componentes de la reacción de digestión con *Eco RV*

Esta reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora y 20 minutos a 80 °C, para la inactivación de la enzima.

El resultado de la electroforesis en gel de agarosa 1% de 2 μL del ADN digerido, se muestra en la siguiente imagen (Figura 4):

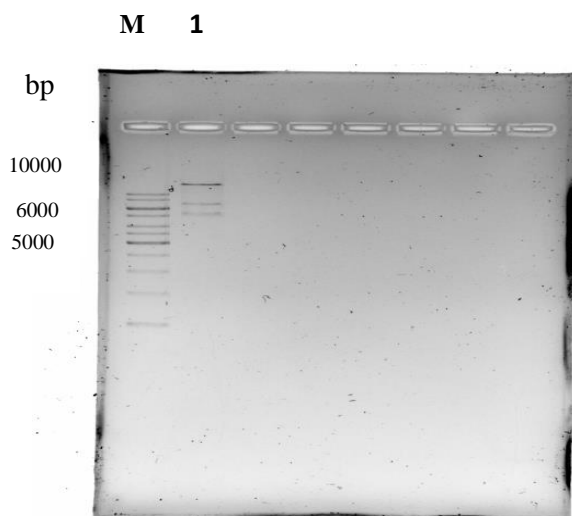


Figura 4. M: Generuler 1 Kb (2 μL + 0.5 μL Gel green). 1: ADN digerido (2 μL + 0.5 μL Gel green)

Como se observa en la Figura 4, la digestión genera tres bandas: una de un tamaño mayor de 10000 pares de bases (bp), y otras dos de 6000 y 5000 bp, respectivamente. El fragmento más pequeño, de 5000 bp, extraído del gel de agarosa, fue el que se utilizó para ligar al plásmido pJET 1.2.

La ligación se llevó a cabo empleando el kit comercial *CloneJET cloning kit* (Thermo Fisher Scientific®), tal como se indica en el punto 3.5.5 (página 11), según la reacción (Tabla 10):

	Volumen (μL)
Buffer	10
Digerido ADN	8
pJET 1.2	1
Ligasa T4	1
Total	20

Tabla 10. Componentes de reacción de ligación.

Esta reacción se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Con este ADN ligado al plásmido, se transformó la bacteria *E. coli* XL1 Blue siguiendo el protocolo indicado en el punto 3.6 (página 11-12). Tras incubación a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche en placa con medio LBA, la ausencia de crecimiento indicó que no hubo transformación.

En un segundo intentó, se utilizaron los 15 μL del ADN digerido sobrantes que no habían sido usados en la reacción de ligamiento, pero duplicando los volúmenes de los componentes de la reacción (Tabla 11):

	Volumen (μL)
Buffer	20
Digerido ADN	15
pJET 1.2	2
Ligasa T4	2
Agua	1
Total	40

Tabla 11. Componentes de reacción de ligación en el segundo intento.

Esta reacción se incubó 30 minutos a temperatura ambiente.

En esta ocasión la bacteria transformada fue *E. coli* DH10B, una cepa que ofrece buenas eficiencias de transformación. Siguiendo el protocolo y tras la incubación en placa con medio LBA, los resultados de la transformación fueron de 18 UFCs.

Estas colonias fueron picadas e incubadas, primero en placa de 96 pocillos y posteriormente en placa *round bottom black*, siguiendo los protocolos indicados en el punto 3.7.1 (página 12). La Tabla 12 indica las lecturas de la fluorescencia en *placa round bottom black*.

	1	2	3
A	51994	53985	53889
B	51301	52693	55036
C	47236	55487	49877
D	55597	57206	50510
E	55496	58889	49608
F	53968	55288	50028
G	56198	55525	47935
H	51835	55056	49246

Tabla 12. Medida en unidades relativas de fluorescencia (URF) del pocillo C9 subclonado (I)

Los transformantes solo fueron cultivados en las columnas 1, 2 y los pocillos A3 y B3, los demás contienen solamente medio.

	1	2	3
A	-7455,02014	-5464,02014	-5560,02014
B	-8148,02014	-6756,02014	-4413,02014
C	-12213,0201	-3962,02014	
D	-3852,02014	-2243,02014	
E	-3953,02014	-560,02014	
F	-5481,02014	-4161,02014	
G	-3251,02014	-3924,02014	
H	-7614,02014	-4393,02014	

Tabla 13. Resultados de la placa de la Tabla 12

Aplicando el criterio mencionado al principio, ninguno de los pocillos se toma como positivo (Tabla 13). Por lo que se realizaron nuevamente dos cultivos del pocillo C9 con 10 mL de medio LB, 3.8 µL de cloranfenicol y 20 µL de arabinosa y se incubaron a 37 °C toda la noche.

Tras la incubación, se realizó una extracción de ADN plasmídico de 4.5 mL de este cultivo. La cuantificación del ADN obtenido por espectrofotometría fue de 18.9 ng/µL. Este ADN fue digerido también con la enzima *Eco RV* (Tabla 14):

	Volumen (µL)
ADN	43
Buffer B (10X)	5
<i>Eco RV</i> (dilución 1/10)	2
Total	50

Tabla 14. Componentes de la reacción de digestión con *Eco RV*

Esta reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora y posteriormente 20 minutos a 80 °C, para la inactivación de la enzima. La electroforesis de esta digestión se realizó en geles de agarosa al 0.7% y se repartió la digestión en tres pocillos (Figura 5):

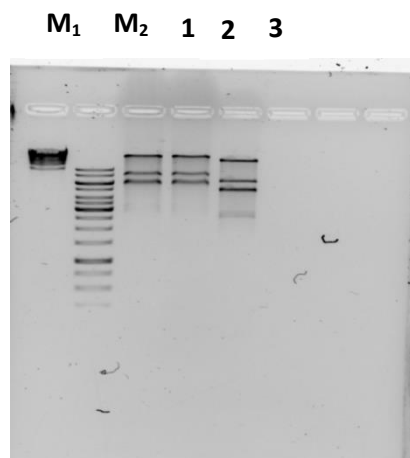


Figura 5. M₁: *GeneRuler High Range* (4 µL + 1 µL gel green). M₂: *GeneRuler 1 kb* (4 µL + 1 µL gel green). 1: ADN digerido (20 µL + 5 µL gel green) 2: ADN digerido (20 µL + 5 µL gel green) 3: ADN digerido (10 µL + 2.5 µL gel green)

De este gel, se extrajeron los dos fragmentos más pequeños, mediante el kit *GeneJET Gel Extraction* y se realizó la ligación al plásmido pJET 1.2, de acuerdo con la siguiente reacción

	Volumen (µL)
Buffer	10
Digerido ADN	7.75
pJET 1.2	1
Ligasa T4	1
Agua	0.25

Tabla 15. Componentes de la reacción de de ligación

Esta reacción se incubó 30 minutos a temperatura ambiente.

Con este ADN ligado, se transformó la bacteria *E. coli* DH10B. Siguiendo el protocolo y tras la incubación en placa con medio LBA, los resultados de la transformación fueron de 26 UFCs.

Estas colonias fueron picadas e incubadas, primero en placa de 96 pocillos y posteriormente en placa *round bottom black*, siguiendo los protocolos indicados en el punto 3.7.1. La Tabla 16 indica las lecturas de la fluorescencia.

	1	2	3	4
A	56148	59121	56956	52433
B	57086	56747	52428	51948
C	53030	49630	51684	51184
D	47769	47135	49612	44989
E	54359	49356	43467	50093
F	51288	46394	45709	43247
G	45603	49188	54534	52598
H	54290	43850	53944	45316

Tabla 16. Medida en unidades relativas de fluorescencia (URF) del pocillo C9 subclonado (II)

Los pocillos cultivados son A1-B4.

	1	2	3	4
A	-3820,36478	-847,364782	-3012,36478	-7535,36478
B	-2882,36478	-3221,36478	-7540,36478	-8020,36478
C	-6938,36478	-10338,3648	-8284,36478	
D	-12199,3648	-12833,3648	-10356,3648	
E	-5609,36478	-10612,3648	-16501,3648	
F	-8680,36478	-13574,3648	-14259,3648	
G	-14365,3648	-10780,3648	-5434,36478	
H	-5678,36478	-16118,3648	-6024,36478	

Tabla 17. Resultados positivos en la placa de la Tabla 16

Dado que ninguno de los resultados obtenidos fueron positivos (Tabla 17), se optó por utilizar el kit comercial *fosmid MAX™ DNA purification kit (Epicentre®)*, que permite mejores extracciones en plásmidos de este tamaño. Algunas características de este kit, así como su protocolo, se indican en el punto 3.5.1 (páginas 8-9).

Con este kit, se realizaron extracciones de cuatro alícuotas. La medida de la concentración de ADN por espectrofotometría fue la siguiente (Tabla 18):

	Concentración (ng/μL)
Alícuota 1	Alta
Alícuota 2	1097.3
Alícuota 3	1478,1
Alícuota 4	765.8

Tabla 18. Concentración del ADN por espectrofotometría.

Con este protocolo, se obtuvieron buenas extracciones de ADN. La concentración en la alícuota 1 resultó demasiado elevada para su lectura por espectrofotometría. Con estos resultados, se decidió trabajar con la alícuota número 2, las demás se conservaron a -20°C .

Como los resultados obtenidos con la enzima de restricción *EcoRV* no fueron positivos, se decidió emplear una nueva enzima de restricción, *Sma I* (Takara®), para las digestiones, según la siguiente reacción (Tabla 19):

	Volumen (μL)
Agua	14
Buffer T (10X)	2
BSA	2
ADN	1
<i>Sma I</i>	1
Total	20

Tabla 19. Componentes de la reacción de digestión con *Sma I*.

Esta reacción se incubó a 30°C durante 1 hora y posteriormente 20 minutos a 65°C , para la inactivación de la enzima.

La ligación se llevó a cabo con el ADN digerido restante (Tabla 20):

	Volumen (μL)
Agua	9
Digerido ADN	8
Buffer	1
pJET 1.2	1
Ligasa T4	1
Total	20

Tabla 20. Componentes de la reacción de ligamiento

La reacción es incubada 30 minutos a temperatura ambiente.

Con este ADN ligado al plásmido, se transformó la bacteria *E. coli* DH10B siguiendo el protocolo indicado en el punto 3.6. Tras incubación de las placas con medio LBA a 37 °C durante toda la noche, se obtuvieron 95 UFCs.

Estas colonias fueron picadas e incubadas, primero en placa de 96 pocillos y posteriormente en placa *round bottom black*, siguiendo los protocolos indicados en el punto 3.7. La siguiente tabla (Tabla 21) indica las lecturas de la fluorescencia en placa *round bottom black*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	66328	60684	71332	65671	63517	66386	56423	62934	66072	63412	52418	83717
B	71348	73028	73334	64603	61254	55520	71928	65883	66003	61893	42258	72606
C	75227	69135	75377	67677	55419	73505	43291	64205	65402	65855	78613	63670
D	77425	66852	64904	77725	57299	65370	59639	67060	61165	68318	75103	68768
E	71186	65518	57434	68796	63812	74717	65562	69531	68473	61228	50654	65084
F	63227	68769	73024	60761	67416	66580	63198	69333	68830	53714	79677	65789
G	73676	65606	72422	75099	64361	70391	66935	66642	66758	54764	59677	67704
H	68264	71465	75015	69881	68371	73852	62137	68963	61505	57225	73113	67232

Tabla 21. Medida en unidades relativas de fluorescencia (URF) del pocillo C9 subclonado (III)

Todos los pocillos están cultivados, menos el H12 (pocillo control).

Aplicando los criterios descritos previamente, se obtiene el pocillo A12 como positivo en actividad proteasa (Tabla 22).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-14299,8391	-19943,8391	-9295,83906	-14956,8391	-17110,8391	-14241,8391	-24204,8391	-17693,8391	-14555,8391	-17215,8391	-28209,8391	3089,16094
B	-9279,83906	-7599,83906	-7293,83906	-16024,8391	-19373,8391	-25107,8391	-8699,83906	-14744,8391	-14624,8391	-18734,8391	-38369,8391	-8021,83906
C	-5400,83906	-11492,8391	-5250,83906	-12950,8391	-25208,8391	-7122,83906	-37336,8391	-16422,8391	-15225,8391	-14772,8391	-2014,83906	-16957,8391
D	-3202,83906	-13775,8391	-15723,8391	-2902,83906	-23328,8391	-15257,8391	-20988,8391	-13567,8391	-19462,8391	-12309,8391	-5524,83906	-11859,8391
E	-9441,83906	-15109,8391	-23193,8391	-11831,8391	-16815,8391	-5910,83906	-15065,8391	-11096,8391	-12154,8391	-19399,8391	-29973,8391	-15543,8391
F	-17400,8391	-11858,8391	-7603,83906	-19866,8391	-13211,8391	-14047,8391	-17429,8391	-11294,8391	-11797,8391	-26913,8391	-950,839062	-14838,8391
G	-6951,83906	-15021,8391	-8205,83906	-5528,83906	-16266,8391	-10236,8391	-13692,8391	-13985,8391	-13869,8391	-25863,8391	-20950,8391	-12923,8391
H	-12363,8391	-9162,83906	-5612,83906	-10746,8391	-12256,8391	-6775,83906	-18490,8391	-11664,8391	-19122,8391	-23402,8391	-7514,83906	

Tabla 22. Resultados positivos en la placa de la Tabla 21

A partir de este pocillo positivo, se cultivaron 10 μL del pocillo en 1 mL de medio LBA para realizar ensayos de actividad proteasa y otros 10 en 5 mL para extracción del ADN plasmídico mediante Miniprep.

La extracción con el kit de Miniprep se realizó en dos alícuotas. Las medidas de la concentración obtenida por espectrofotometría se presentan en la siguiente tabla (Tabla 23):

	Concentración (ng/ μL)
Alícuota 1	48.1
Alícuota 2	60.3

Tabla 23. Concentración del ADN por espectrofotometría.

Este DNA así obtenido, se utilizó para realizar una secuenciación en los servicios de secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del SAI de la Universidad de A Coruña.

4.3 Resultados ensayos actividad enzimática.

Siguiendo el protocolo indicado en el punto 3.8 (pág. 13), se ensayó la actividad proteasa del clon obtenido tras la subclonación a dos temperaturas distintas (37°C y 70°C) y se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 6):

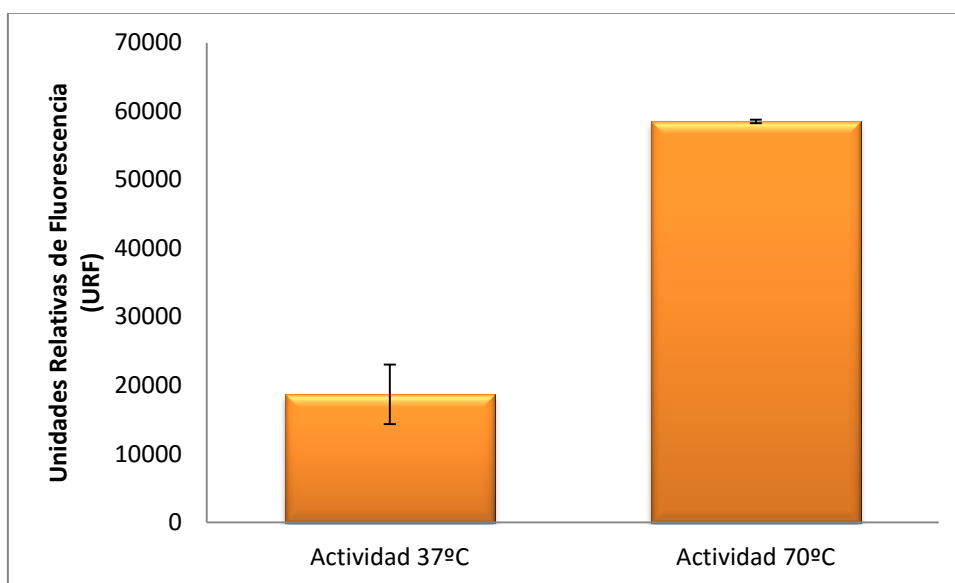


Figura 6. Resultados de actividad proteasa dados en unidades relativas de fluorescencia determinados a diferentes temperaturas. Los valores muestran la media +/- la desviación estándar (N=3).

Se puede observar que la actividad proteasa es mayor en las muestras a 70°C que a 37°C , siendo unas 3 veces mayor la actividad obtenida a 70°C que a 37°C . Estos datos tienen

sentido, al tratarse de una proteasa aislada de una metagenoteca de aguas termales, Río Caldo (Lobios, Ourense), con una temperatura de surgencia de 76°C .

4.4 Resultados secuenciación.

La secuencia obtenida al utilizar el primer directo del pJET 1.2 fue:

```
GCTCGAGTTTCAGCAGATGGGCGAGCTCGGGCATGGCGTAGGCGAGAAGGCTCCCCAGGGCGAAGA
GGCCGTAGAGGAAGAGGTTGGTGAAGAGGTAAGGCCCTCTGGGACCGACCAAGGCCAGGCCT
CAAGAAGCCAGGCCCGGAAGGGGGAGGGCCTGAGGAGGAGGAAGACCCAAAAGAGGGAGAGGAGGA
AAAACCCAAAGCCCGCGAGGGGGCGTGAGGAGGTAGGCGGGCACCCCGAGCCCCTCGGGGCGGAAGT
AGACCCGCCTGGCCTCCCCCCTTCCAGGACCACCACCTCCCCACCTCCTCCCCGAGGGCGG
CCGGGAAGGAGACCCGGTTCCCCTCCACCTCGGGGCTTTCAGGTTGACGGTAAGCCCATCGGGGG
GCGGGGGGAAGAGGGCGAAGCGCTCGAGGAGCCTCGGGGCTCCTCCGGAGGGGCCCTAAGGACCT
CCTCGAGGCTCGGGGAGAGCTCCCCCTGAGCCACCGGGCGACGGCTCCCTTGCGGCCTCCTCCG
GGCCCGGAGGGCCAGGGAGAAAAGGCCGAGAAGAAGGGCAGCGAGGAAGCGCACCCCTAGACCTCC
TCCAAGGGCACCCCTCCCGGCAGAGGGGGCAGGCCTCCTCGGGATACTGGGGAACCTCCAAGGCG
AGGAGCACGGGCGGCCAGGGGGTGTCTGTGCGTTGTTGCCAATCTCATTAAGTGCAGCTGGCAC
GACAGTTTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCA
TTATGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTTGTGAGCGGAT
ACCATTTTCACACAGGAACAGCTATGACCATGAATTAC
```

La secuencia obtenida al utilizar el primer inverso del pJET 1.2 fue:

```
GGAACCTTCTAGAAGATGGGGCTGCAGGATTCGATATCAAGCTTGGAGTATTCTATAGTCTCACCTA
AATAGCTTGGGCGTAATCATGGGTCATAGCTGGTTTTCTGGTGTGAAATTAGTTATCCGCTCACAA
TTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAAC
TCACATTAATTGCGTTGCGTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATT
AATGAATCGGCCAACGCGAACCCTTGCGGCCGCCCGTGCTCCTCGCCTTGGAGGTTCCCCAGTAT
CCCAGGAGGCCTGCCCCCTCTGCCGGGAGGGGTGCCCTTGGAGGAGGTCTAGGGTGCCTTCCCT
CGCTGCCCTTCTTCTCGGCCTTTTCTCCCTGGCCCTCGCGGCCCGGAGGAGGCCGCAAGGGAGGC
CGTCGCCCCGGTGGCTCAGGGGGGAGCTCTCCCCGAGCCTCGAGGAGGTCCTTAGGGCCCCCTCCGGA
GGAGGCCCGGAGGCTCCTCGAGCGCTTCGCCCTCTTCCCCCGCCCCCGATGGGCTTACCGTCAA
CCTGGAAAGCCCCGAGGTGGAGGGGAACCGGGTCTCCTTCCCGGCCGCCCTCGGGGAGGAGGTGGG
GGGAGGTGG
```

Una vez obtenida la secuencia, se empleó el programa BlastX del NCBI para la búsqueda de posibles proteínas homologas existentes en otros microorganismos. El BlastX es un programa de la familia Blast que traduce la secuencia nucleotídica en sus seis posibles

marcos de lectura (tres marcos de lecturas por hebra) y compara estas secuencias traducidas contra una base de datos de proteínas. Se usa cuando, como en nuestro caso, se tiene sospecha de que la secuencia de entrada codifica para una proteína pero no se sabe exactamente cuál es su producto. Al introducir las secuencias en el programa BlastX del NCBI y compararlas con la base de datos, nuestra secuencia se alinea con secuencias de proteínas hipotéticas de organismos como *Thermus thermophilus*, *Thermus parvatiensis*, *Thermus aquaticus*, *Thermus scotoductus*, *Thermus caliditerrae*, *Thermus amyloliquefaciens*, *Meiothermus timidus*, *Marinithermus*, *Oceanithermus*, etc. La mayoría se trata de organismos que se encuentran en ambientes termales, resultado que parece lógico dada la procedencia de la metagenoteca. En la tabla 24 se recogen los 15 mejores resultados obtenidos con el programa BlastX para la secuencia directa.

Posible Función/microorganismo	Puntuación total	% identidad (% cobertura)	N.º de acceso
Proteína hipotética (<i>Thermus thermophilus</i>)	221	97 (53)	WP_011173762.1
Proteína hipotética (<i>Thermus thermophilus</i>)	221	97 (53)	WP_014629024.1
Proteína hipotética (<i>Thermus thermophilus</i>)	221	97 (53)	WP_024118767.1
Proteína hipotética (<i>Thermus thermophilus</i>)	219	96 (53)	WP_011228882.1
Proteína hipotética (<i>Thermus thermophilus</i>)	219	96 (53)	WP_014510833.1
Proteína hipotética (<i>Thermus parvatiensis</i>)	204	96 (52)	WP_008633503.1
Proteína hipotética conservada (Grupo bacteriano de <i>Thermus/Deinococcus</i> no cultivado)	192	86 (53)	BAL57645.1
Proteína hipotética (<i>Thermus aquaticus</i>)	185	79 (53)	WP_003043558.1
Proteína hipotética (<i>Thermus aquaticus</i>)	182	78 (53)	WP_053767501.1
Proteína hipotética (<i>Thermus scotoductus</i>)	182	78 (53)	WP_026329121.1
Proteína hipotética (<i>Thermus sp.</i> 2.9)	179	81 (53)	WP_039459079.1
Proteína hipotética (<i>Thermus caliditerrae</i>)	179	77 (53)	WP_051913591.1
Proteína hipotética (<i>Thermus scotoductus</i>)	179	78 (52)	WP_015716287.1
Proteína hipotética (<i>Thermus sp.</i> NMX2.A1)	178	79 (52)	WP_038032538.1
Proteína hipotética (<i>Thermus amyloliquefaciens</i>)	176	78 (53)	WP_038055629.1

Tabla 24. Secuencias que han producido alineamientos significativos con BlastX

Los resultados obtenidos para la secuencia inversa no se muestran dado que ninguna de las proteínas hipotéticas obtenidas mostraron más del 30% de cobertura, pero al igual que con

la secuencia directa la secuencia inversa se alineó también con proteínas hipotéticas de organismos de ambientes termales.

5. CONCLUSIONES

1. La búsqueda funcional de actividad proteasa en una metagenoteca de aguas termales (Rio Caldo, Lobios, Ourense) mediante la detección de la fluorescencia emitida en presencia del sustrato fluorescente contenido en el kit comercial *EnzChek® Protease Assay Kits E6638 Molecular Probes (Thermo Fisher Scientific®)* ha permitido aislar clones con actividad proteasa. Este método ha demostrado ser un método rápido y sencillo para la detección de la actividad proteasa a muy bajos niveles.
3. Se consiguió la subclonación del pocillo con actividad proteasa positiva en el vector de expresión pJET1.2 y en la cepa de *Escherichia coli* DH10B, tras digestión con la enzima de restricción *SmaI*.
4. Los ensayos de actividad proteasa han dado tres veces mayor actividad a 70°C que a 37°C.
5. Se realizó la secuenciación del pocillo subclonado positivo y se analizó esta secuencia mediante la herramienta bioinformática *BlastX*, resultando que la secuencia se alinea con secuencias de proteínas hipotéticas de organismos termófilos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amann RI., Ludwig W., Schleifer KH. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143–69.

Angelov, A., Mientus, M., Liebl, S., Liebl W. (2009). A two-host fosmid system for functional screening of (meta)genomic libraries from extreme thermophiles. *Syst. Appl. Microbiol.*, 32:177-185.

Antranikian, G., Herzberg, C., Gottschalk, G. (1987) Production of thermostable α -amylase, pullulanase and α -glucosidase in continuous culture by a new *Clostridium* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1668–1673

Bahrami, A., Shojaosadati, S., Mahbeli, G. (2001) Biodegradation of dibenzothiophene by thermophilic bacteria. *Biotechnol. Lett.* 23, 899–901.

Bauer, M., Driskil, L., Callen, W., Snead, M., Mathur, E., Kelly, R. (1999) An endoglucanase EglA, from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* hydrolyzes α -1,4 bonds in mixed linkage (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)- β -D-glucans and cellulose. *J. Bacteriol.* 181, 284–290.

Becker, P. (1997) Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil. *Appl. Microb. Biotechnol.* 48, 184–190.

Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis. *Journal of Bacteriology* 62: 293-300.

Bharat, B., Hoondal, G. (1998) Isolation, purification and properties of thermostable chitinase from an alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. *Biotechnol. Lett.* 20, 157–159.

Burrows, W. (1973) Text Book of Microbiology. W.B. Saunders Company, Ontario.

Cottrell MT, Moore JA, Kirchman DL. (1999) Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2553–57.

Cowan, D. (1996) Industrial enzyme technology. *Trends Biotechnol.* 14 (6), 177–178.

Crab, W., Mitchinson, C. (1997) Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Trends Biotechnol.* 15, 349–352.

- Ekkers, D., Cretoiu, M., Kielak, A., Van Elsas, J. (2012).** The great screen anomaly- a new frontier in product discovery through functional metagenomics. *Applied microbiology and biotechnology* 93 (3). 1005-1020.
- Emmanuel, L., Stefan, J., Bernard, H., Abdel, B. (2000)** Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 3–14.
- Fan, Z., Zhu, Q., Dai, J. (2001)** Enzymatic treatment of wool. *J. Dong Hua University (English edition)* 18, 112–115.
- Fernández-Arrojo L, Guazzaroni ME, López-Cortés N, Beloqui A, Ferrer M (2010)** Metagenomic era for biocatalyst identification. *Curr Opin Biotechnol* 21(6): 725–733
- Gabor EM, de Vries EJ, Janssen DB. (2003)** Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44: 153–63.
- Gabor, E.M., de Vries, E.J., Janssen, D.B. (2004)** Construction, characterization, and use of small-insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases. *Environ. Microbiol.* 6, 948–958.
- Groboillot, A. (1994)** Immobilization of cells for application in the food industry. *Crit. Rev. Biotechnol.* 14, 75–107.
- Gupta, R., Beg Q.K., Lorenz P. (2002)** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 15–32.
- Haki, G., Rakshit S.K. (2003)** Developments in industrially thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology* 89 (1). 17-34.
- Handelsman, J. (2004).** Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganism 68 (4). 669-685.
- Henne A, Daniel R, Schmitz RA, Gottschalk G. (1999)** Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3901–7.

- Henne A, Schmitz RA, Bomeke M, Gottschalk G, Daniel R. (2000)** Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3113–16.
- Kohilu, U., Nigam, P., Singh, D., Chaudhary, K. (2001)** Thermostable, alkaliphilic and cellulase free xylanases production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C. *Enzyme Microb. Technol.* 28, 606–610.
- Krahe, M., Antranikian, G., Markel, H. (1996)** Fermentation of extremophilic microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 271–285.
- Kumar, S., Nussinov, R. (2001)** How do thermophilic proteins deal with heat? A review. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1216–1233.
- Ladenstein, R., Antranikian, G. (1998)** Proteins from hyperthermophiles stability and enzymatic catalysis close to the boiling point of water. *Adv. Biochem Eng/Biotechnol.* 61: 37-85.
- Lämme, K., Zipper, H., Breuer, M., Hauer, B., Buta, C., Brummer, H., Rupp, S., (2007)** Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression. *Journal of Biotechnology* 127: 572-592.
- Lee, S.W., Won, K., Lim, H.K., Kim, J.C., Choi, G.J., Cho, K.Y. (2004)** Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 720–726.
- López-López, O., Knapik, K., Cerdán, M.E., González-Siso, M.I. (2015).** Metagenomics of an Alkaline Hot Spring in Galicia (Spain): Microbial Diversity Analysis and Screening for Novel Lipolytic Enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1291.
- Mothersky, S., Marmer, W., Dale, A.O. (2002)** Vigorous proteolysis: Relining in the presence of an alkaline protease and bating (Post- Liming) with an extremophile protease. *JALCA* 97, 150–155.
- Mozhaev, V. (1993)** Mechanism-based strategies for protein thermo- stabilization. *Trends Biotechnol.* 11, 88–95.
- Nyyssönen, M., Tran, H.M., Karaoz, U., Weihe, C., Hadi, M.Z., Martiny, J.B.H, Martiny, A.C., Brodie, E.L. (2013)** Coupled high-throughput functional screening an next

generation sequencing for identification of plant polymer decomposing enzymes in metagenomics libraries. *Front Microbio.*, 4:282.

Peter, W., Alexandra, T., Klaus, D. (2001) Conversions of glycerol to 1,3-propandiol by a newly isolated thermophilic strain. *Biotechnol. Lett.* 23, 463–466

Poonam, N., Dalel, S. (1995) Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme Microb. Technol.* 17, 770–778.

Ramirez Ortega, A., Rial Lemos, M., Ramirez Masferrer, J., (2007). Las aguas minero-medicinales de Galicia: un patrimonio geológico singular. *De Re Metallica* 8. 49-64.

Richardson TH, Tan X, Frey G, Callen W, Cabell M. (2002) A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable alpha-amylase. *J. Biol. Chem.* 277: 26501–7.

Riesenfeld, C., Schloss, P., Handelsman, J., (2004). Genomics analysis of microbial communities. *Annual review of genetics* 38 (1). 525-552.

Rhee, J.K., Ahn, D.G., Kim, Y.G., Oh, J.W. (2005) New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 817–825.

Robertson, D.E., Chaplin, J.A., DeSantis, G., Podar, M., Madden, M., Chi, E., Richardson, T., Milan, A., Miller, M., Weiner, D.P., Wong, K., McQuaid, J., Farwell, B., Preston, L.A., Tan, X., Snead, M.A., Keller, M., Mathur, E., Kretz, P.L., Burk, M.J., Short, J.M. (2004) Exploring nitrilase sequence space for enantioselective catalysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2429– 2436.

Rondon MR, August PR, Bettermann AD, Brady SF, Grossman TH. (2000) Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2541–47.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, second ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Sarikaya, E., Higassa, T., Adachi, M., Mikami, B., (2000) Comparison of degradation abilities of a- and b-amylases on raw starch granules. *Proc. Biochem.* 35, 711–715.

- Satosi, H., Seigo, O., Kenji, T., Kazuhisa, K., Tetsuo, K., Toshiaki, K., Hitosi, K. (2001)** Chemo-enzymatic synthesis of 3-(2-naphthyl)- L-alanine by an amino transferase from the extreme thermophiles *Thermococcus profundus*. *Biotechnol. Lett.* 23, 589–591
- Singh B, Gautam SK, Verma V, Kumar M, Singh B (2008)** Metagenomics in animal gastrointestinal ecosystem: potential biotechnological prospects. *Anaerobe* 14(3): 138–144.
- Solbak, A.I., Richardson, T.H., McCann, R.T., Kline, K.A., Bartnek, F., Tomlinson, G., Tan, X., Parra-Gessert, L., Frey, G.J., Podar, M., Luginbuhl, P., Gray, K.A., Mathur, E.J., Robertson, D.E., Burk, M.J., Hazlewood, G.P., Short, J.M., Kerovuo, J. (2005)** Discovery of pectin-degrading enzymes and directed evolution of a novel pectate lyase for processing cotton fabric. *J. Biol. Chem.* 280, 9431–9438.
- Song, J.S., Jeon, J.H., Lee, J.H., Jeong, S.H., Jeong, B.C., Kim, S.J., Lee, S.H. (2005)** Molecular characterization of TEM-type beta-lactamases identified in cold-seep sediments of Edison Seamount (south of Lihir Island, Papua New Guinea). *J. Microbiol.* 43, 172–178.
- Uchiyama T, Miyazaki K (2009)** Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Curr Opin Biotechnol* 20(6): 616–622.
- Van den Burg, B. (2003)** Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current opinion in microbiology* 6 (3). 213-218.
- Van Elsas JD, Speksnijder AJ, van Overbeek LS (2008)** A procedure for the metagenomics exploration of disease-suppressive soils. *J Microbiol Methods* 75:515–522
- Voget S, Leggewie C, Uesbeck A, Raasch C, Jaeger KE. (2003)** Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6235–42.
- Warnecke F, Luginbuhl P, Ivanova N, Ghassemian M, Richardson TH, Stege JT, Cayouette M, McHardy AC, Djordjevic G, Aboushadi N, Sorek R, Tringe SG, Podar M, Martin HG, Kunin V, Dalevi D, Madejska J, Kirton E, Platt D, Szeto E, Salamov A, Barry K, Mikhailova N, Kyrpides NC, Ottesen EA, Zhang XN, Hernandez M, Murillo C, Acosta LG, Rigoutsos I, Tamayo G, Green BD, Chang C, Rubin EM, Mathur EJ, Robertson DE, Hugenholtz P, Leadbetter JR (2007)** Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature* 450(7169):560–565

Yun, J., Kang, S., Park, S., Yoon, H., Kim, M.J., Heu, S., Ryu, S. (2004)
Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7229–7235.