

Trabajo Fin de Master

Expresión y caracterización de enzimas aisladas de fuentes termales usando metagenómica funcional.

Expresión e caracterización de enzimas illadas de fontes termais usando metaxenómica funcional.

Expression and characterization of enzymes isolated from hot springs using functional metagenomics.

Autor: Simón Rodríguez Moar

Tutores: Manuel Becerra Fernández y M^a Isabel González Siso

Titulación: Máster en Biotecnología Avanzada

Área: Bioquímica y Biología Molecular

Curso: 2019/2020

Fecha de entrega: 03/02/2020

Autorización de los tutores:

La Dra. M^a Isabel González Siso y el Dr. Manuel Becerra Fernández, en calidad de tutores de este Trabajo de Fin de Máster, autorizan su presentación ante el Tribunal Evaluador.

Área de Bioquímica y Biología Molecular.

Facultad de Ciencias; Universidad de A Coruña

A Coruña, 3 de **Febrero** de 2020

Firmado:

M^a Isabel González Siso

Manuel Becerra Fernández

Simón Rodríguez Moar

Tabla de contenido

| | |
|--|----|
| Resumen: | 3 |
| Resumo: | 3 |
| Abstract: | 4 |
| 1. Introducción..... | 5 |
| 1.1. ¿Qué es una enzima y por qué son interesantes para la industria?..... | 5 |
| 1.2. ¿Cuáles son las distintas fuentes de enzimas?..... | 6 |
| 1.3. Celulasas y Lipasas: | 8 |
| 1.3.1. Celulasas:..... | 8 |
| 1.3.2. Lipasas: | 8 |
| 1.4. Técnicas metagenómicas para el estudio de enzimas de interés | 9 |
| 2. Objetivos..... | 10 |
| 3. Material y Métodos..... | 10 |
| 3.1. Material biológico | 10 |
| 3.2. Medios de cultivo | 11 |
| 3.3. PCR..... | 12 |
| 3.4. Transformación de levaduras y bacterias | 13 |
| 3.5. Geles de agarosa | 14 |
| 3.6. Métodos de extracción de DNA: | 14 |
| 3.7. Obtención de extracto crudo de levaduras..... | 14 |
| 3.8. Métodos de detección de actividad endocelulasa..... | 15 |
| 3.9. Métodos de caracterización de lipasa | 16 |
| 4. Resultados y Discusión..... | 18 |
| 4.1. Expresión de CelB4 en levaduras | 18 |
| 4.2. Caracterización de la lipasa | 20 |
| 5. Conclusiones..... | 27 |
| 6. Bibliografía..... | 29 |

Resumen:

Las enzimas son proteínas capaces de transformar un sustrato específico en productos, acelerando la reacción química. Por ello despiertan gran interés para la industria, y en la actualidad se utilizan en multitud de procesos. Los microorganismos constituyen la mejor fuente para su obtención, y en la búsqueda de nuevas enzimas microbianas podemos hacer uso de técnicas de metagenómica que nos permitan identificar las secuencias que las codifiquen.

En el presente Trabajo de Fin de Máster se pretende expresar una celulasa (CelB4) y la caracterización de una lipasa (LipD11) obtenidas de metagenotecas de las aguas termales de Río Caldo, Lobios, provincia de Ourense.

Por un lado, para la enzima CelB4 por el momento no se ha conseguido ningún clon de levadura que sea capaz de expresar la enzima. Por su parte, LipD11 ha demostrado ser una lipasa termoestable, con preferencia por ácidos grasos de 8 carbonos, y que se puede considerar apta para su uso en la formulación de detergentes teniendo en cuenta como su actividad se ve favorecida por la presencia de algunos agentes surfactantes y detergentes comerciales.

Resumo:

As enzimas son proteínas capaces de transformar un substrato específico en produtos, acelerando a reacción química. Por iso despertan grande interese para a industria, e na actualidade utilízanse en multitude de procesos. Os microorganismos constitúen a mellor fonte para a súa obtención, e na procura de novas enzimas microbianas podemos facer uso das técnicas de metaxenómica que permítannos identifica-las secuencias que as codifiquen.

No presente Traballo de Fin de Máster preténdese expresar unha celulasa (CelB4) e a caracterización dunha lipasa (LipD11) obtidas de metaxenotecas das augas termais de Río Caldo, Lobios, provincia de Ourense.

Por un lado, para a enzima CelB4 polo momento non se conseguiu ningún clon de lévedo que sexa capaz de expresa-la enzima. Pola súa parte, LipD11 demostrou ser unha lipasa termostabel, con preferencia polos ácidos graxos de 8 carbonos, e que pódese considerar axeitada para o seu uso na formulación de deterxentes tendo en conta como a súa actividade vese favorecida pola presenza dalgúns axentes surfactantes e deterxentes comerciais.

Abstract:

Enzymes are proteins which are capable of transforming a specific substrate into products, accelerating the chemical reaction. That is the reason why they awake such interest for industry, and nowadays enzymes are used in multiple industrial processes. Microorganisms constitute the best source for enzyme acquisition, and in the search for new microbial enzymes we can make use of metagenomic techniques which allow us to identify the sequences that codify them.

In the present Master's Dissertation, our goals are the expression of a cellulase (CelB4) and the characterization of a lipase (LipD11) which were both obtained from Rio Caldo, Lobios, province of Ourense using metagenomics.

On the one hand, we could not manage yet to obtain a yeast clone capable of expressing the CelB4 enzyme. On the other hand, LipD11 has proven to be thermostable, showing preference for 8 carbon fatty acids, and it can be considered suitable for the formulation of detergents, taking into account how the presence of some surfactant agents and commercial detergents promote its activity.

1. Introducción

1.1. ¿Qué es una enzima y por qué son interesantes para la industria?

Una de las condiciones para que la vida tenga lugar es que un organismo ha de ser capaz de catalizar reacciones químicas de manera eficiente y selectiva. Para ello existen las enzimas, que con la excepción de los RNA catalíticos, son en su mayoría proteínas capaces de transformar un sustrato específico en productos, acelerando tremendamente la reacción química. Funcionan además en condiciones poco agresivas a diferencia de otros catalizadores químicos o sintéticos (Nelson & Cox, 2018).

Teniendo en cuenta estas características, es comprensible que despierten gran interés por parte de la industria ya que suponen un ahorro energético y económico. Se ha llegado a decir que en la industria, para cada proceso que incluya al menos una reacción química, se podría introducir una enzima (Rodríguez Alegría & Castillos Rosales, 2014).

Los estudios realizados durante el siglo XX, que determinaron la naturaleza de las enzimas como proteica, así como el desarrollo de técnicas para su análisis y purificación fueron clave para su introducción en la industria, tanto para su producción como uso (Polaina & MacCabe, 2007).

Aunque en algunos casos las enzimas han sido utilizadas desde la antigüedad, como es el caso del cuajo en la producción de queso (Fox et al., 2017), en 1833 Anselme Payen puso a la venta la diastasa (Payen & Persoz, 1833), y en 1914 las enzimas fueron incluidas por primera vez en un detergente por parte de industrias Röhm, no fue hasta los años 60 cuando se comenzó su producción a escala industrial por parte de Novo Industries (Rodríguez Alegría & Castillo Rosales, 2014).

Desde entonces, algunas de las enzimas que han sido utilizadas en la industria son:

- **Pectinasas** en el procesado de la fruta para obtener un mayor rendimiento en la obtención de zumos (Sakai et al., 1993).
- **Lactasa** en la industria láctea, para la producción de leche sin lactosa (Dekker et al., 2019).
- **Bromelina** en la industria cárnica, para obtener carnes más tiernas (Arshad et al., 2014).

- **Papaínas** también en la industria cárnica, con el fin de ablandar las carnes (Fernández-Lucas et al., 2017).

1.2. ¿Cuáles son las distintas fuentes de enzimas?

Las enzimas pueden tener un origen animal (cuajo animal, Fox et al., 2017), vegetal (bromelina, Arshad et al., 2014) o microbiano (ejemplos Tabla 1). Dado que los microorganismos pueden ser cultivados en cantidades relativamente grandes y períodos de tiempo cortos, son ideales como fuente de enzimas y para su producción industrial. Además, con tecnologías de DNA recombinante, podemos expresar enzimas de origen animal o vegetal en microorganismos, con las ventajas que esta tecnología implica (Hatti-Kaul, 2009).

Algunas de las enzimas que son obtenidas de microorganismos y su aplicación en la industria se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Aplicaciones industriales de enzimas microbianas (Singh et al., 2016).

| Industria | Enzima | Función | Microorganismo |
|------------------|---------------|----------------------------------|--|
| Láctea | Lipasa | Maduración queso | <i>Aspergillus niger</i> |
| | Proteínasas | Coagulación de la leche | <i>Aspergillus sp.</i> |
| | Lactasa | Reducción de la lactosa en leche | <i>Escherichia coli</i> <i>Kluyveromyces lactis</i> |
| Panificadora | Amilasa | Ajustes en la harina | <i>Aspergillus sp.</i> <i>Bacillus sp.</i> |
| | Xilanasa | Acondicionamiento de la masa | <i>Aspergillus niger</i> |
| Papelera | Lacasa | Deslignificación, blanqueamiento | <i>Bacillus subtilis</i> |
| | Celulasa | Destintado | <i>Bacillus sp.</i> <i>Aspergillus niger</i> |
| | Xilanasa | Blanqueamiento | <i>Trichoderma reesei</i> |
| Detergentes | Amilasa | Manchas de carbohidratos | <i>Aspergillus sp.</i> <i>Bacillus subtilis</i> |
| | Lipasa | Manchas de grasas | <i>Aspergillus oryzae</i> <i>A. flavus</i> |

| | | | |
|-----------|----------------------|---------------------------------|---|
| | Proteasa | Manchas proteicas | <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Bacillus subtilis</i> |
| Cosmética | Superóxido dismutasa | Eliminación de radicales libres | <i>Corynebacterium glutamicum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| | Proteasa | Eliminación de piel muerta | <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Bacillus subtilis</i> |
| | Lacasa | Tinción capilar | <i>Bacillus subtilis</i> <i>Trametes versicolor</i> |

Aunque los microorganismos sean la solución ideal para la producción de enzimas a nivel industrial, no todos los microorganismos son cultivables en condiciones de laboratorio.

Entre estos microorganismos no cultivables están aquellos que se pueden encontrar en ambientes extremos, los cuales pueden contener enzimas que resulten interesantes. Un ejemplo serían los que viven en aguas termales a altas temperaturas (más de 70°C). Las enzimas de estos microorganismos pueden resultar atractivas ya que serán altamente termoestables, pudiendo soportar temperaturas de reacción más altas de lo normal durante períodos de tiempo más largos sin desnaturalizarse. Para el estudio de estas enzimas podemos utilizar técnicas de metagenómica que se describirán más detalladamente en el apartado 1.4 de esta introducción.

Un ejemplo de lo útiles y/o revolucionarias que pueden llegar a ser las enzimas termoestables es la Taq polimerasa, obtenida del termófilo *Thermus aquaticus*. El impacto de esta enzima se debe a la manera en la que simplificó el procedimiento de amplificación de DNA *in vitro* (Saiki et al., 1988). Este descubrimiento le valió a Kary Mullis el premio Nobel de química en 1993 (Nobel Prize Organisation, 2019) además de los casi 2.000 millones de dólares en royalties que ha generado la patente de la técnica para los dueños de esta, un éxito rotundo (Fore Jr et al., 2006).

1.3. Celulasas y Lipasas:

Las enzimas con las que se ha desarrollado el presente trabajo de fin de máster son una celulasa y una lipasa obtenidas mediante metagenómica funcional a partir de muestras de aguas termales. Antes de entrar en materia para explicar el trabajo desarrollado, se proporcionará un marco teórico más detallado acerca de estos dos tipos de enzimas.

1.3.1. Celulasas:

Llamamos celulasas al grupo de enzimas que rompen el enlace β -1,4 glicosídico. La actuación secuencial de este grupo de enzimas, consistente en 3 distintas, permite la degradación del biopolímero de celulosa a azúcares simples como monómeros de glucosa. En primer lugar se requiere de la acción de las endoglucanasas, que rompen las uniones internas de las moléculas de glicano, dando como producto celooligosacáridos. La acción de la siguiente enzima, la celobiohidrolasa (CBH), permite obtener a partir del anterior producto moléculas de celobiosa, que acabará por dar monómeros de glucosa gracias a la última enzima, la β -glucosidasa. Así, partiendo de un biopolímero como es la celulosa, obtenemos finalmente azúcares simples y fácilmente fermentables (Potprommanee et al., 2017).

Teniendo en cuenta el producto que se obtiene, es entendible el interés que puedan despertar por parte de la industria relacionada con los combustibles, por ejemplo, ya que facilitaría la producción de bioetanol (Potprommanee et al., 2017), o también la industria papelera, que utiliza las celulasas debido a las modificaciones beneficiosas que esta realiza sobre los materiales celulósicos (Cadena, 2009).

Por último, el interés que generan las celulasas termoestables se debe a que la hidrólisis de polímeros de celulosa ocurre generalmente a temperaturas que están entorno a los 50°C. Con enzimas no termoestables, tenemos un rendimiento en la hidrólisis más pobre a estas temperaturas, con las consecuencias que esto tenga para los procesos en los que las celulasas sean integradas en las industrias interesadas (Patel et al., 2019).

1.3.2. Lipasas:

Las lipasas son aquellas enzimas capaces de catalizar la hidrólisis de triglicéridos a glicerol y ácidos grasos. Según la posición en la que la hidrólisis tenga lugar, decimos que se trata de:

- Lipasa no específica: hidroliza el triglicérido a glicerol y ácidos grasos, con di- y mono- acilglicerol como intermediarios.
- Lipasa 1,3 específica: capaz de liberar los ácidos grasos de las posiciones 1 y 3 de triglicéridos
- Lipasa específica de ácidos grasos: hidroliza ésteres con ácidos grasos de cadena larga.

Este tipo de enzimas despierta gran interés en la industria de los detergentes, ya que su adición a éstos proporciona una mayor capacidad para eliminar manchas difíciles, y además son más respetuosos con el medio ambiente que ciertos componentes más agresivos que puedan contener los detergentes. En la industria farmacéutica pueden ser utilizadas en la producción de antioxidantes, o con fines diagnósticos como es el caso de la tuberculosis. También son empleadas en la industria alimentaria para la eliminación de grasa en la leche o la maduración de los quesos (Javed et al., 2018).

Finalmente, cabe señalar que la termoestabilidad en lipasas es un requerimiento para la excelencia en su aplicación industrial, ya que le permitiría a la enzima soportar temperaturas más altas que tal vez sean necesarias en procesos industriales, resistiendo más que las enzimas procedentes de organismos mesófilos (Shariff et al., 2011).

1.4. Técnicas metagenómicas para el estudio de enzimas de interés

Previo a los experimentos realizados en el presente Trabajo de Fin de Máster, se llevó a cabo la recolección de muestras, que consisten en aguas procedentes de la fuente termal de Río Caldo, Lobios, provincia de Ourense, Galicia, España. De estas aguas se realizó un estudio metagenómico para identificar enzimas con actividad de interés industrial. Se construyó una librería metagenómica con fósmidos, y posteriormente se realizó un cribado funcional, con el fin de detectar actividades enzimáticas de interés (Knapik et al., 2019). La actividad de la endocelulasa se detectó en placas de cultivo en presencia del sustrato carboximetilcelulosa mientras que para la actividad lipolítica se empleó el sustrato tributirina. En ambos casos se obtuvieron clones positivos que fueron subclonados en el plásmido pJET1.2 (Figura 1). Para este trabajo se dispuso del clon con el gen de la endocelulasa en el plásmido pJET1.2 con el objetivo de subclonarlo en un plásmido de expresión de levaduras. Por otra parte, el gen de la lipasa fue clonado en el plásmido YEpFLAG-1 (Figura 1) y expresado usando como hospedador la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505. El plásmido YEpFLAG-1 presenta una señal de

secreción que dirige la lipasa al medio extracelular. En el presente trabajo se utilizó el ultrafiltrado del medio de cultivo para caracterizar bioquímicamente la lipasa.

2. Objetivos

El presente Trabajo de Fin de Máster está dividido en dos objetivos:

-Expresión en levaduras de la endocelulasa CelB4 aislada de una fuente termal mediante metagenómica funcional.

-Caracterización bioquímica de la lipasa LipD11 obtenida a partir de una metagenoteca de aguas termales y expresada heterológicamente en levaduras.

3. Material y Métodos

3.1. Material biológico

Microorganismos:

- *Escherichia coli* ECOSTM Blue [*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)]*], (suministrada por Galmedic): esta cepa fue utilizada para la propagación del vector de expresión YEpFLAG-1 (Figura 1), ya que la extracción de DNA plasmídico en levaduras tiene un rendimiento mucho más bajo y obtenemos menos DNA. Las incubaciones para este microorganismo se realizaron a 37°C.
- *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 [*pep4:: HIS3, prb-Δ1.6R HIS3, lys2-208, trp1-Δ101, ura 3-52, gal2, can1*] (Eastman Kodak Company): esta cepa de levaduras fue utilizada para recombinar el vector de expresión YEpFLAG-1 con el gen de la endocelulasa CelB4 con el objetivo de expresar el gen de manera heteróloga. Es una cepa auxótrofa para el triptófano, pero al transformarla con este vector, puede crecer en el medio CM-Trp descrito más adelante. Las incubaciones de este microorganismo se realizaron a una temperatura de 30°C, y con agitación para los medios líquidos.
- *Escherichia coli* Epi300 [*F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ-rpsL nupG trfA dhfr*], (Epicentre): esta cepa era la que contenía el gen CelB4 de la endocelulasa en el vector pJET1.2 (Figura 1). Con este material se realizó una extracción de

DNA con el kit que se indica más adelante, para conseguir suficiente DNA con el que realizar una PCR.

Vectores:

- pJET1.2 (*ThermoFisher*): este plásmido es un vector portador del gen de la endocelulasa CelB4 (Figura 1).

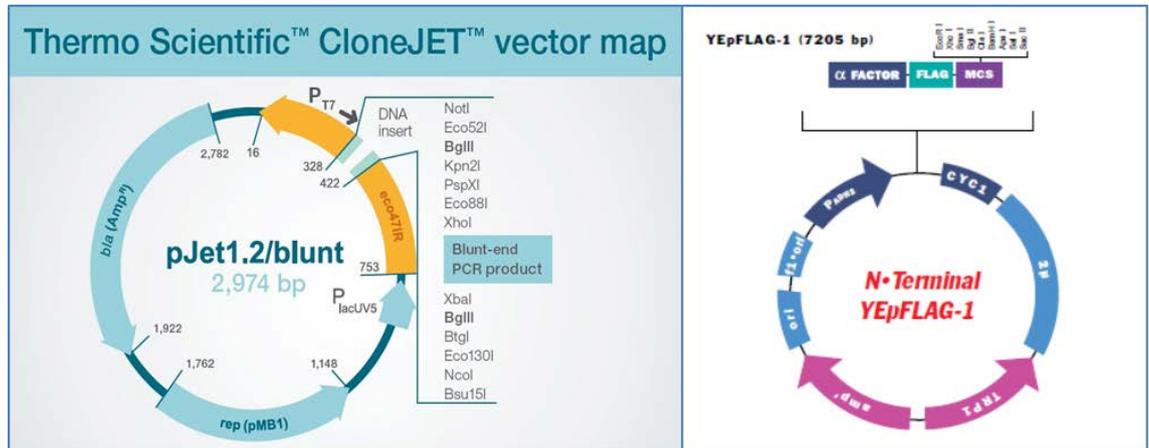


Figura 1: mapas del vector pJET1.2 y el vector de expresión YEpFLAG-1 extraídos de las respectivas casas comerciales (Sigma Aldrich, n.d.; ThermoFisher Scientific - UK, n.d.).

- YEpFLAG-1 [*amp^r ori 2μ FLAG TRP1*] (*Eastman Kodak Company*): es el vector de expresión empleado para intentar clonar CelB4 mediante recombinación homóloga y expresar la enzima en la cepa de levadura BJ3505. Para transformar la cepa de *Saccharomyces* BJ3505 se linearizó el plásmido con las enzimas de restricción *Xho* I y *Sal* I (*Takara*), utilizando un *buffer* que fuera compatible para las dos enzimas.

3.2. Medios de cultivo

- LBA (*Luria-Bertani*; 1% bactotripton, 0.5 % extracto levadura, 0.5 % NaCl): este medio se utilizó para crecer las bacterias ECOS Blue transformadas. Contiene el antibiótico ampicilina 100 mg/L, que se le añade tras autoclavar el resto de componentes y dejar enfriar la mezcla por debajo de los 65°C.
- CM-Trp (Zitomer & Hall, 1976): el medio CM-Trp es un medio completo sin triptófano que se utilizó para crecer selectivamente a las levaduras de la cepa BJ3505 de *S. cerevisiae* (auxótrofas para el triptófano) que fueron transformadas con éxito. Además de aminoácidos (salvo el triptófano) y glucosa, contiene YNB como fuente de nitrógeno, vitaminas y elementos traza (Zitomer & Hall,

1976), que se autoclava por separado y se añade a la mezcla en condiciones estériles y a una temperatura menor a 60°C.

- CM-Trp+CMC: Este medio fue utilizado para crecer de manera selectiva a aquellas levaduras que expresan la enzima endocelulasa CelB4. Presenta la misma composición que el CM-Trp con la excepción de que se sustituye la glucosa al 2% como fuente de carbono por la carboximetil celulosa (CMC) al 2%.
- YPHSM (1% extracto levadura, 8% bactopectona, 1% glucosa, 3% glicerol): fue empleado como medio de alta estabilidad para la expresión de la proteína heteróloga en levaduras.

Todos los medios de cultivo se prepararon en agua destilada, añadiendo 1,5% de agar cuando se necesitó preparar medios sólidos. Así mismo, todos los medios se esterilizaron en un autoclave durante 20 minutos a 121°C y 2 Ba de presión.

3.3. PCR

Se utilizó la PCR para amplificar el gen de la endocelulasa CelB4 a partir del plásmido pJET1.2 que lo contenía. Los oligonucleótidos utilizados fueron:

- CelRecF: AAAGAAGAAGGGGTACCTTTGGATAAAAGAATGAGTACTC
ATGGTTTACAA
- CelRecR2: TGGGACGCTCGACGGATCAGCGGCCGCTTAATCAGGGCGA
GCAGTTGTTGA

Las bases resaltadas en amarillo son las que recombinan con el plásmido YEpFLAG-1, mientras que el resto es la zona que sirve para amplificar la endocelulasa.

Phusion Polymerase: Para las reacciones de amplificación de DNA se utilizó la polimerasa de alta fidelidad *Phusion High Fidelity DNA Polymerase* de *ThermoFisher*.

Para realizar la PCR, 20 ng de DNA molde (pJET1.2 conteniendo el gen de la CelB4) se incubaron con 3 microlitros de cada uno de los cebadores (a una concentración de 10 pMoles/microlitro), 2 microlitros de dNTPs 0,25 mM, 4 microlitros de tampón 5X de la polimerasa, 2 microlitros de la polimerasa y se añadió agua hasta un volumen final de 20 microlitros.

Se empleó el siguiente protocolo de la PCR: etapa inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos y posteriormente, 30 ciclos con una desnaturalización inicial a 94°C

de 1 minuto, hibridación a 65°C por 1 minuto y elongación a 72°C durante 1 minuto. Tras los 30 ciclos, se realizó una elongación final a 72°C durante 10 minutos.

Se realizó una purificación del producto de la PCR para eliminar los restos de cebadores y nucleótidos que pudieran quedar, usando el GeneJET Gel Extraction Kit de la casa comercial ThermoFisher. Se siguieron las instrucciones del proveedor. El resultado de la PCR se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.4. Transformación de levaduras y bacterias

- Levaduras:

Para la transformación de la cepa de levadura BJ3505, previamente se linearizó el plásmido YEpFLAG-1 mediante digestión enzimática, para la que se utilizaron las enzimas *Xho* I y *Sal* I. La mezcla consistió en 11,5 µL de YEpFLAG-1, 1 µL de *Xho* I, 1 µL de *Sal* I y 1,5 µL de tampón 10XA, que es compatible con las dos enzimas. Esta mezcla se dejó incubar a 37°C durante 2 horas, para finalmente proceder a transformar las levaduras BJ3505 (previa comprobación de la correcta linearización en un gel de agarosa), dejando incubar 50 µL de células de levadura competentes con 3 µL de producto de la PCR de *CelB4* y 2 µL de YEpFLAG-1. Para la preparación de las células de levadura competentes así como para la transformación de las mismas se siguió el protocolo del kit de transformación Frozen-EZ Yeast Transformation II de Zymo Research. Las células transformadas se sembraron en placas CM-Trp, y se dejaron crecer durante 48-72 horas a 30°C. De la misma manera se elaboró un control negativo que consistió en transformar las levaduras únicamente con el YEpFLAG-1 linearizado.

Con este procedimiento, se busca que la maquinaria de recombinación de las levaduras incorpore el producto de la PCR en el plásmido YEpFLAG-1.

- Bacterias:

Las bacterias competentes ECOSTM Blue fueron transformadas utilizando el DNA extraído de las levaduras que crecieron en medio CM-Trp resultado del proceso de transformación. Se procede de la misma manera que con las levaduras, tras descongelar las células en hielo, se les añadió el DNA, se dejó incubar durante 10 minutos en hielo y se les aplicó un choque térmico a la mezcla (42°C 90 segundos). Tras el choque térmico se dejaron las células en hielo 5 minutos y se les añadió

medio LB para posteriormente incubar las células durante una hora a 37°C. Finalmente las células se sembraron en placas LBA y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Se realiza este paso a causa de que la extracción de DNA para levaduras tiene un rendimiento más bajo, y de esta forma obtener mayor cantidad.

3.5. Geles de agarosa

Se prepararon geles de agarosa al 0,7% para verificar la clonación del plásmido (YE_pFLAG-1) con el inserto (CelB4) así como para comprobar los resultados de la amplificación del gen CelB4 mediante PCR. El marcador utilizado en estos geles fue el GeneRuler 1 kb DNA Ladder de Fermentas. Los geles de agarosa al 0,7% se realizaron usando el tampón Tris-EDTA-Acetato (Tris 0,04 M, EDTA 1mM, acetato sódico 20 mM, ácido acético 30 mM). Las electroforesis se realizaron a un voltaje de unos 60 mV por espacio de 1 hora aproximadamente. La composición del tampón de carga 10x fue la siguiente: 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilen-cianol y 30% de glicerol en 1xTE. Como agente intercalante para teñir los ácidos nucleicos se empleó el GelGreen de la casa comercial Biotium. Para visualizar las muestras se utilizó el aparato Gel Doc XR+ System (BioRad).

3.6. Métodos de extracción de DNA:

Se utilizó el kit comercial *GeneJet Plasmid Miniprep Kit* de *ThermoFisher* siguiendo las instrucciones del proveedor.

3.7. Obtención de extracto crudo de levaduras

Para la obtención de extractos crudos de levaduras se utilizó un método mecánico: rotura por agitación en vórtex con perlas de vidrio. Se empleó un tampón de extracción cuyos componentes favorecen la solubilidad de las proteínas para evitar la desnaturalización y agregación (Tris-HCl 0,2 M, pH 7,8; (NH₄)₂SO₄ 0,3 M, MgCl₂ 10 mM, EDTA 1mM, glicerol 10%).

Se utilizó un cultivo de levaduras en medio líquido YPHSM de 72 horas de edad. El cultivo fue centrifugado a 7000 rpm durante 10 minutos. Se realizó un lavado con tampón de extracción frío, se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en 1 mL de tampón de extracción. Se añadieron perlas de vidrio y se aplicaron 10 pulsos de 20 segundos en el vórtex con pausas de 20 segundos en hielo entre cada pulso. Se

centrifugó la mezcla a 8000 rpm durante 15 minutos para separar los restos celulares y las perlas de vidrio y se extrajo el sobrenadante cuidadosamente con ayuda de una micropipeta.

3.8. Métodos de detección de actividad endocelulasa

De los candidatos que crecieron en medio CM-Trp, se seleccionaron 6 a los cuales se les realizó una extracción de DNA con el Kit comercial GeneJet Plasmid Miniprep Kit de ThermoFisher siguiendo las instrucciones del proveedor, para a continuación transformar bacterias ECOsTM Blue, crecerlas en medio LBA y realizar de nuevo una extracción de DNA. Se realizó un gel de agarosa de la manera descrita previamente para comprobar cuáles de esos 6 candidatos habían incorporado el plásmido YEpFLAG-1 con el gen CelB4. En base a este criterio, se seleccionaron 2 candidatos, con los que se llevaron a cabo las pruebas de actividad endocelulasa.

- Prueba de actividad con el sustrato AZCL-He-Cellulose:

Se utilizó el sustrato en cuestión en una disolución acuosa al 0,75%. Se mezclaron 250 μ L de disolución de sustrato, 15 μ L de extracto crudo y 85 μ L de citrato sódico (200 mM, pH 5,5). Los tubos se incubaron durante 30 minutos a 30°C con agitación para posteriormente realizar la medida de la absorbancia a $\lambda = 590$ nm, utilizando como blanco un pocillo sin extracto crudo.

- Prueba de actividad endocelulasa por determinación de azúcares reductores:

Este método (Bernfeld, 1951) determina la cantidad de azúcar reductor liberado del sustrato CMC (carboximetilcelulosa) preparado al 2% en agua bidestilada. Se mezclan 100 μ L de extracto crudo con 150 μ L de buffer McIlvaine a pH 6,5 [0.2 M Na₂HPO₄ (A), 0.1 M ácido cítrico (B)]. El pH 6.5 se ajusta por la adición de (B) a (A) a 65°C] y con 250 μ L de sustrato (CMC 2%), se incuban durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se mezclan 0,5 mL de muestra con 0,5 mL de reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico al 1%, tartrato Na-K-4H₂O al 30%, y NaOH 0,4 M), y se coloca la muestra 5 minutos a 100°C. Al mismo tiempo se prepara un blanco en el que la muestra es sustituida por agua destilada. Tras la reacción, se deja enfriar la mezcla a temperatura ambiente, se diluye con 5 mL de agua destilada, y se mide la absorbancia a $\lambda = 540$ nm. Se realizó un calibrado con diluciones preparadas que

tenían concentraciones crecientes de glucosa (de 0,25 mg/ml a 2,5 mg/ml) para así construir una curva patrón.

- Prueba de actividad endocelulasa con Congo Red:

Para esta última prueba, se seleccionaron 90 candidatos de la placa de levaduras transformadas con el YEpFLAG-1. Cada candidato fue sembrado por duplicado, en una placa CM-Trp en la que la fuente de carbono es CMC (CM-Trp+CMC), y en una placa CM-Trp normal. Se sembraron 30 candidatos por placa, usando tres placas de cada tipo. Tras 72 horas en las placas CM-Trp+CMC se eliminan las colonias lavándolas con agua destilada y se añade Rojo Congo 0,5%, dejándolo incubar un máximo de 15 minutos, tras lo que se realizan lavados sucesivos con NaCl 1M. Se preparó también un control positivo utilizando una placa CM-Trp+CMC y una celulasa comercial (Sigma-Aldrich).

3.9. Métodos de caracterización de lipasa

Esta segunda parte experimental del presente Trabajo de Fin de Máster consistió en la caracterización de una lipasa por medio de ensayos de estimación de actividad lipolítica.

- Reacción estándar:

La reacción para estimar la actividad lipolítica consistió en un ensayo espectrofotométrico en el que se empleó el p-nitrofenil dodecanoato o laurato (pNP12) como sustrato, siguiendo el procedimiento descrito por (Fuciños et al., 2005). Utilizando una disolución madre de pNP12 25mM en etanol, se mezclaron en tubos de *Eppendorf* 320 μ L del tampón de reacción (Tris HCl 50 mM, pH 8,5 con CaCl₂ 40 mM) y 40 μ L de la solución madre de sustrato, dejando incubar los tubos 5 minutos a 60°C. Pasado este tiempo, se añaden 40 μ L del extracto enzimático y se deja incubar 20 minutos a 60°C. A continuación se añade 100 μ L de Na₂CO₃ frío con el fin de desnaturalizar la enzima, y se colocan los tubos durante 10 minutos en un baño de hielo. Se clarifica la muestra por centrifugación durante 10 minutos a 13.000 rpm, y se realiza la lectura de la absorbancia de 200 μ L a $\lambda = 400$ nm con un lector de microplacas Sinergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader (*BioTek*). Para el blanco se intercambi6 la enzima por agua bidestilada.

- Determinación de la estabilidad térmica de la lipasa:

Se probó la estabilidad térmica de la lipasa a distintas temperaturas durante períodos de tiempo crecientes. Se incubó el extracto enzimático a 80°C durante 5, 10, 15, 20, 30 y 45 minutos, a 85°C durante 2, 4, 6, 8, 10, 15 y 20 minutos y a 90°C durante 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 15 minutos. Se preparó un tiempo cero y las muestras se realizaron por triplicado. Tras la incubación en bloque térmico las muestras se ponen en hielo hasta la posterior determinación de la actividad enzimática mediante el método estándar de actividad lipolítica.

- Determinación de la temperatura óptima de la lipasa:

Para establecer la temperatura óptima de la lipasa se empleó el procedimiento habitual pero realizando las medidas de actividad lipolítica a diferentes temperaturas: a 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 y 80°C. Las muestras se prepararon por triplicado.

- Determinación de la especificidad de la lipasa frente a distintos sustratos p-nitrofenil ésteres:

En esta prueba se utilizaron 20 sustratos p-nitrofenil preparados por la empresa Galchimia (O Pino, A Coruña) a una concentración de 0,2 mM, Se utilizó el tampón de reacción suplementado al 0,1% con goma arábica y al 1% con CHAPS para minimizar la autohidrólisis de los sustratos. Para esta prueba se utilizaron 8 µL de sustrato y 352 µL de tampón suplementado, y se midió la actividad enzimática a 40°C. Se preparó un blanco para cada sustrato sin la enzima. Las medidas se realizaron por triplicado.

- Determinación de la influencia de iones metálicos:

Para esta medida se probaron los iones $MgCl_2$, $MnCl_2$, $ZnSO_4$ y $NiCl_2$ a concentraciones 0,1, 1 y 10 mM. Se prepararon las muestras por triplicado y un blanco para cada caso en el que se sustituía la enzima por agua bidestilada. No se incluyó el $CaCl_2$ porque ya está presente en el tampón utilizado para medir la actividad.

- Determinación de la influencia de surfactantes:

En este caso se utilizaron los agentes surfactantes SDS, CHAPS, Tween 20 y Triton X-100 a concentraciones 0,1, 1 y 10% v/v para los líquidos y 0,1, 1 y 10 mM para

los sólidos. Se dejó incubar la enzima con el buffer y el agente surfactante durante 1 hora a 30°C, usando como control la enzima en buffer sin agentes. Las muestras se realizaron por triplicado y se preparó un blanco para cada caso en el que la enzima fue sustituida por agua bidestilada.

- Determinación de la estabilidad frente a detergentes comerciales:

Se utilizaron 4 detergentes comerciales distintos: Dixan Aromaterapia, Jabón de Marsella de Eroski, Vanish Oxiaction Crystal White y Somat 8 Acciones. Los detergentes sólidos se preparan a una concentración final de 7 mg/mL, mientras que los líquidos se diluyen 100 veces, utilizando en ambos casos el tampón de reacción. Los detergentes pueden contener enzimas, de modo que para evitar que la actividad de éstas afecte a los resultados, se colocan los tubos en un baño a 80°C durante 30 minutos para inactivar las enzimas del detergente. A continuación se añade el extracto enzimático de la lipasa y se deja incubar 1 hora a 30°C, para posteriormente medir la actividad utilizando el procedimiento habitual. Se utilizan como controles la enzima incubada sin detergentes y cada detergente sin enzima. Las muestras se prepararon por triplicado, así como el tubo control con la enzima.

- Determinación de la capacidad para eliminar manchas:

Se utilizaron 4 piezas de algodón limpias (4 cm x 4 cm) que se ensuciaron con 100 µL de chocolate con leche. Las piezas se lavaron de manera independiente durante una hora en un vaso de precipitados con un agitador magnético para simular una lavadora, en 100 mL de agua del grifo. El primer vaso contenía únicamente agua del grifo, el segundo detergente más la enzima lipasa, el tercero sólo detergente, y el cuarto detergente con las enzimas inactivadas suplementado con la enzima lipasa. El detergente se añadió de manera que quedara diluido 100 veces. Se añadieron 226 µL de enzima en los casos correspondientes para que quedara en 500 U/mL. Tras una hora de lavado, se retiran las piezas, se aclaran con agua del grifo y se secan.

4. Resultados y Discusión

4.1. Expresión de CelB4 en levaduras

Para la primera parte del presente Trabajo de Fin de Master, la transformación de la cepa *Saccharomyces* BJ3505 fue exitosa, habiendo crecido colonias en el medio CM-

Trp para las levaduras transformadas con YEpFLAG-1 y el producto de PCR de CelB4, mientras que para el control negativo de levaduras transformadas sólo con YEpFLAG-1 linearizado apenas crecieron colonias. Dado el gran número de colonias obtenidas, se quiso verificar con las enzimas de restricción *Cla* I y *Sal* I, con posterior visualización en geles de agarosa al 0,7%, si 6 candidatos seleccionados al azar, de los cuales solo 4 crecieron en el medio LBA al transformar bacterias con el DNA extraído de las levaduras, habían incorporado exitosamente el vector y el inserto. Los resultados obtenidos (Figura 1) no se pueden considerar exitosos, ya que la digestión con *Cla* I debía haber dado una banda de 7511 pb y otra de 753 pb, mientras que para *Sal* I se esperaba obtener una única banda de 8264 pb.

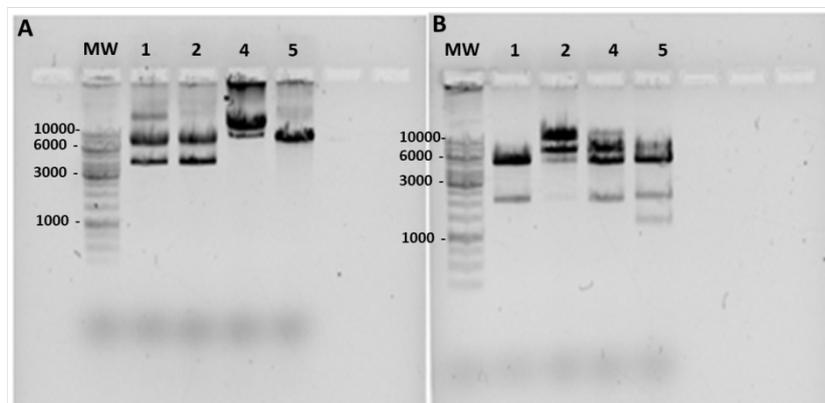


Figura 1: Digestión de YEpFLAG-1+inserto con *Sal* I (A) y *Cla* I (B) de los candidatos 1, 2, 4 y 5. El primer pocillo con muestra en ambos geles (MW) es el marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder de Fermentas.

Dado que los resultados obtenidos en las pruebas con enzimas de restricción no fueron concluyentes, se decidió realizar pruebas para detectar la actividad enzimática con los candidatos obtenidos en la transformación.

Sin embargo, no se pudo detectar actividad endocelulasa a lo largo de las tres pruebas distintas realizadas. Para la prueba con el sustrato AZCL-He-Cellulose no se pudo

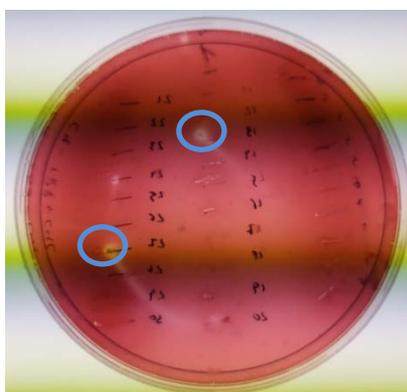


Figura 2: Placas de CM-Trp+CMC sembradas con 30 candidatos, teñidas con Rojo Congo, con posibles candidatos que tal vez expresen la enzima CelB4 (círculos azules)

detectar actividad ya que las medidas espectrofotométricas no presentaban cambios notables entre las muestras y el blanco utilizado.

En el segundo intento, con la prueba de detección de azúcares reductores, tras el proceso de incubación no se apreciaba el cambio de color que realiza la mezcla al haber azúcares reductores libres. Con la medida

espectrofotométrica tampoco se apreciaba cambio alguno en la muestra con respecto al tubo blanco.

En la última prueba realizada para detectar actividad endocelulasa, utilizando una tinción de Rojo Congo, y tras dejar las placas más de una semana destiñendo, se pudieron observar unos pequeños halos en las posiciones de algún candidato (Figura 2). Esto nos hizo pensar que tal vez esos candidatos puedan expresar la enzima en cuestión.

Sin embargo, por el momento, no se pudo confirmar si estos candidatos expresan o no la enzima CelB4 ni si presentan el plásmido con el inserto correctamente clonado.

Aunque por ahora no hemos sido capaces de identificar ningún candidato con el plásmido y el inserto clonado, el hecho de no haber obtenido ningún candidato que exprese la enzima puede deberse a que esta enzima no se expresa correctamente en levaduras, aunque esta hipótesis está pendiente de verificar hasta encontrar un candidato que contenga el vector con el inserto correctamente clonado y determinar la presencia o ausencia de actividad celulasa.

4.2. Caracterización de la lipasa

A la espera de verificar algún candidato positivo de la endocelulasa y dado que había posibilidades de que no se consiguiese expresar adecuadamente en levaduras, se decidió caracterizar una lipasa obtenida mediante metagenómica funcional de aguas termales que se disponía en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular. Al igual que lo que se intentó hacer con la endocelulasa, esta lipasa se había clonado en el vector YEpFLAG-1 y expresado correctamente en levaduras. Como se ha comentado previamente, el vector YEpFLAG-1 presenta una señal de secreción que dirige la expresión del gen hacia el medio extracelular. En este trabajo se utilizó un medio de cultivo concentrado por ultrafiltración para caracterizar a la enzima.

- Determinación de la estabilidad térmica:

Se testó la estabilidad térmica de la enzima a tres temperaturas distintas durante períodos de tiempo crecientes. Los cálculos realizados permitieron representar el porcentaje de actividad con respecto a la actividad inicial a tiempo cero que se consideró como el 100% (Figura 3).

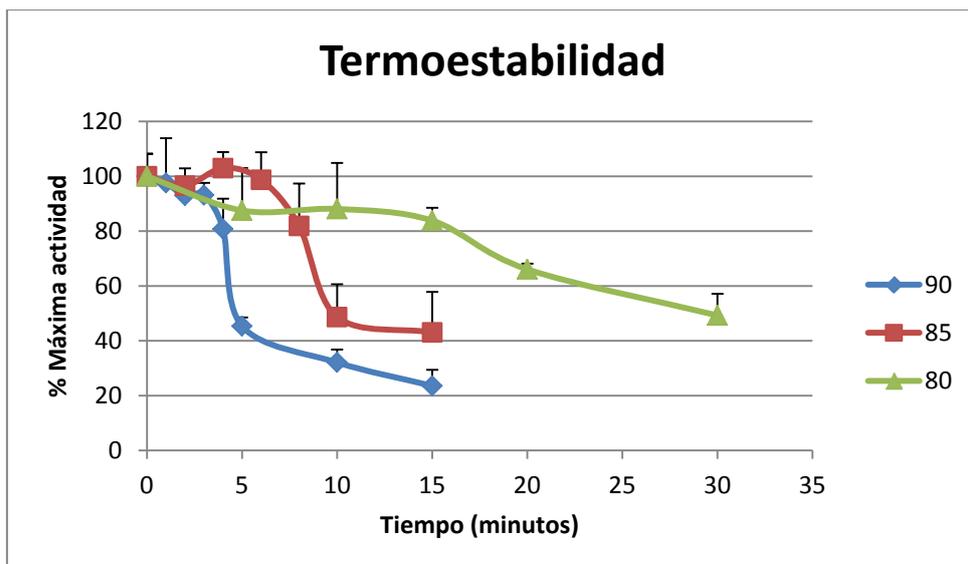


Figura 3: Medida de la termoestabilidad de la lipasa, expresada en % con respecto a la actividad inicial registrada

En la gráfica superior (Figura 3) podemos observar como la actividad lipolítica disminuye con el paso del tiempo, siendo el descenso mucho más drástico cuando se expone a temperaturas muy elevadas, como a 90°C. Esto se debe a una desnaturalización de la enzima dada la exposición a altas temperaturas durante períodos prolongados en el tiempo.

En trabajos similares llevados a cabo por otros autores, por ejemplo el llevado a cabo por Royter y colaboradores (Royter et al., 2009) con las enzimas lipasas de *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* SOL1 y *Caldanaerobacter subterraneus* subespecie *tengcongensis*, la lipasa del primero es más termoestable que la nuestra, manteniendo hasta un 60% de actividad residual después de 50 minutos de incubación a 90°C. Por otro lado, la lipasa de *C. subterraneus* subsp. *tengcongensis*, tras 10 minutos de incubación a 90°C pierde toda la actividad, mientras que nuestra lipasa, tras 15 minutos todavía presenta alrededor de un 20% de actividad.

- Determinación de la temperatura óptima de la lipasa:

Se realizaron medidas de la actividad a distintas temperaturas para determinar la temperatura óptima para el funcionamiento de la lipasa.

Se determinó la actividad de la enzima a 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 y 80°C. En la Figura 4, podemos observar como el % de actividad de la enzima va incrementándose hasta alcanzar un pico de actividad a 75°C, para a continuación bajar bruscamente. Para

calcular los porcentajes de actividad se consideró este valor más alto (a 75°C) como el 100% de la actividad.

En el trabajo realizado por Royter y colaboradores (Royter et al., 2009), sus enzimas alcanzaban picos de actividad también a 75°C tras lo que la actividad decrecía, aunque para estos experimentos los tiempos de reacción fueron tan solo de 10 minutos, y el sustrato utilizado, el p-nitrofenil palmitato. Por otro lado, para la lipasa de *Geobacillus* sp. TW1 caracterizada por Li y Zhang (Li & Zhang, 2005) podemos observar un pico de actividad mucho más bajo, a 40°C.

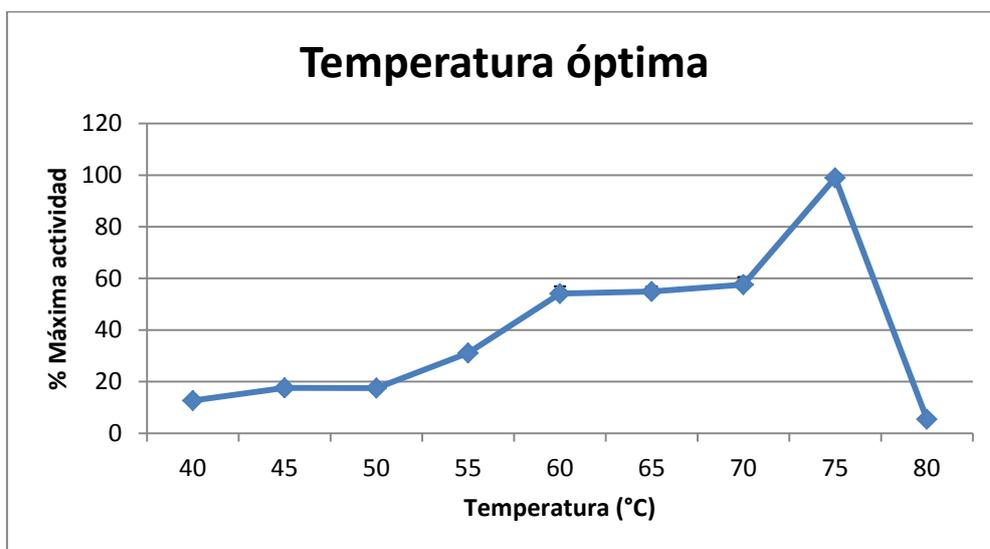


Figura 4: Determinación de la temperatura óptima. La actividad máxima registrada se consideró como el 100% de actividad.

- Determinación de la especificidad de la lipasa frente a distintos sustratos p-nitrofenil ésteres:

Se buscó determinar si la lipasa presentaba algún tipo de selectividad frente a distintos sustratos de tipo ésteres de p-nitrofenil. Con los resultados obtenidos y tras calcular el porcentaje de actividad relativa de la enzima para cada uno de los sustratos utilizados, se elaboró la Figura 5.

Podemos observar distintos niveles de actividad enzimática relativa que se deben a una preferencia de la enzima por determinados sustratos, encontrando el máximo de actividad con el sustrato número 87 (4-nitrofenil-5-fenilpentanoato). Este sustrato presenta un anillo aromático unido al grupo carboxilo hidrolizable por una cadena hidrocarbonada de 4 grupos metilo (-CH₂). La actividad con este sustrato nos permite obtener a grandes rasgos una idea de cómo puede ser el centro activo de la enzima, en

este caso concreto nos indicaría que debe haber un aminoácido con cadena lateral aromática a una distancia de unos 4 metilos de las cadenas laterales de los aminoácidos que llevan a cabo la actividad catalítica.

En base a estos resultados, la enzima podría tratarse de una esterasa, debido a su preferencia por sustratos que consisten en ácidos grasos de cadena corta (C6, C8, Figura 5), a diferencia de las enzimas estudiadas por Royter y colaboradores (Royter et al., 2009), que mostraban preferencia por sustratos con una longitud de entre 8 y 12 carbonos, lo que incluye el sustrato utilizado en los experimentos del presente trabajo, p-nitrofenil laurato.

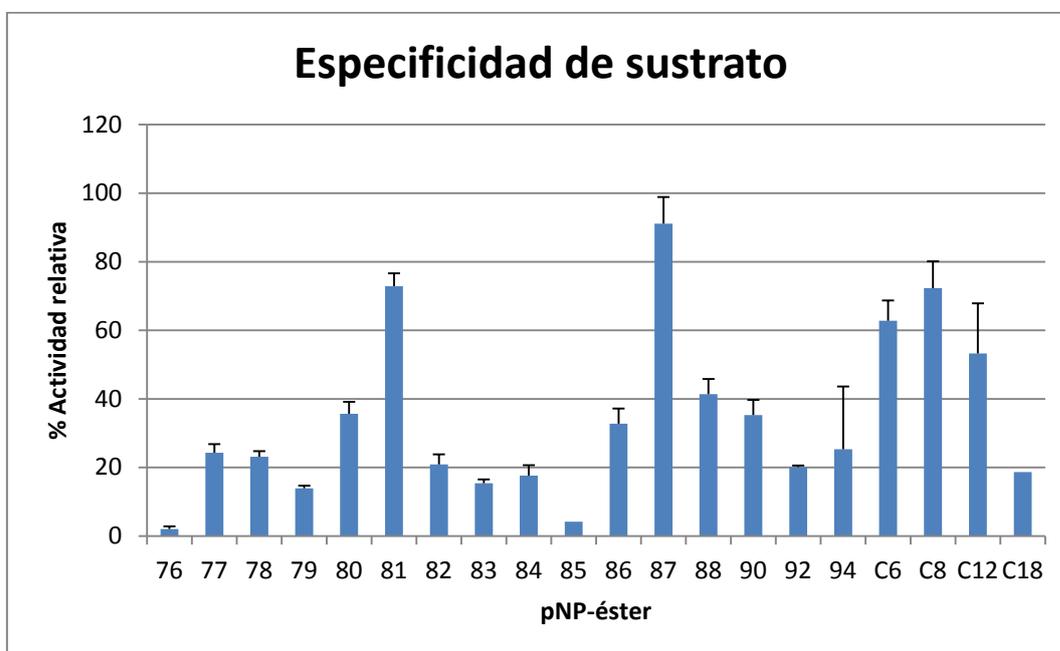


Figura 5: % de actividad relativa de la lipasa frente a 20 sustratos sintéticos diferentes de tipo p-nitrofenil.

- Determinación de la influencia de iones metálicos:

Con esta prueba se busca determinar el efecto que tienen los iones metálicos sobre la actividad de la lipasa, sin contar con el CaCl_2 puesto que ya está incluido en el *buffer* normal.

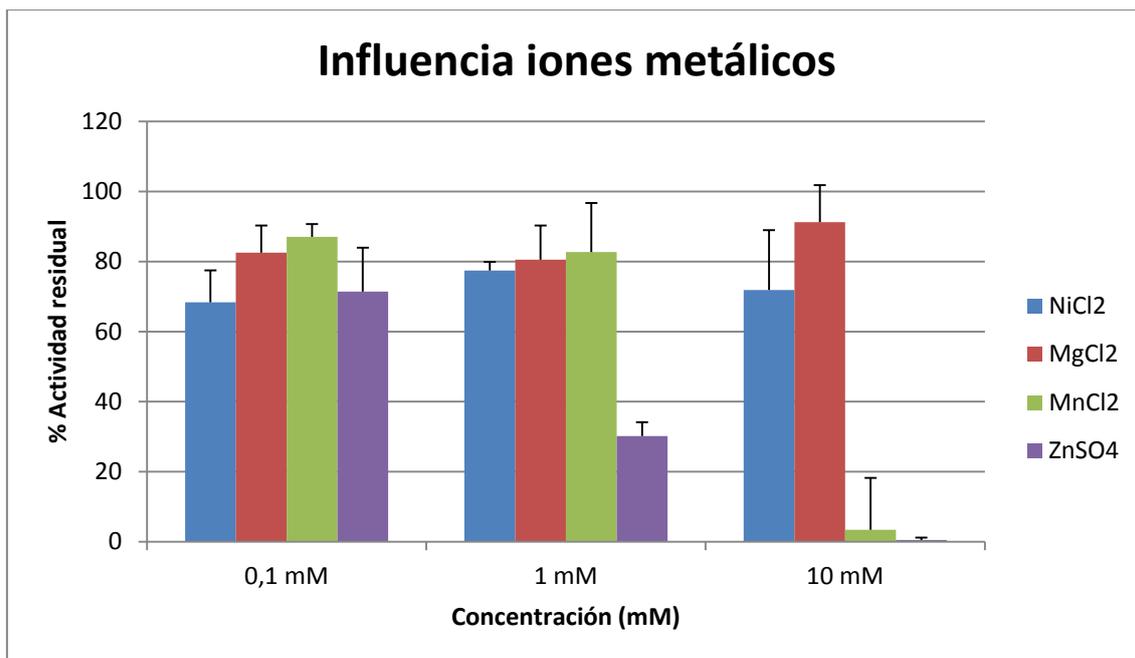


Figura 6: Influencia que tienen distintas concentraciones de iones metálicos sobre la actividad enzimática

Basándonos en los resultados obtenidos que se muestran en la Figura 6, podemos decir que los iones $MgCl_2$ y $NiCl_2$ serían inocuos para la actividad de la enzima ya que el porcentaje de actividad residual de la enzima se mantiene aproximadamente a pesar del incremento en la concentración de los iones. Para el $MgCl_2$, parece haber un incremento de la actividad entre las concentraciones 1 y 10 mM.

En contraposición, podemos ver como disminuye claramente el % de actividad residual de la enzima en el caso del $ZnSO_4$ y el $MnCl_2$ conforme incrementamos su concentración, siendo especialmente notable el descenso que sufre la actividad de la enzima en presencia del ión $MnCl_2$ al incrementar su concentración de 1 mM a 10 mM.

En el trabajo llevado a cabo por Li y Zhang (Li & Zhang, 2005) con la lipasa de *Geobacillus* sp. TW1, la actividad de esta enzima también se ve beneficiada por la presencia de iones Mg^{2+} . Tiene también el mismo efecto para la actividad de la lipasa de *Geobacillus* sp. TW1 la presencia de $MnCl_2$ que en nuestro caso.

- Determinación de la influencia de surfactantes:

Para esta prueba se buscaba determinar el efecto que los agentes surfactantes tienen sobre la actividad de la lipasa. Los resultados obtenidos (Figura 7) nos indican que estamos frente a casos distintos entre sí.

Para el CHAPS, a bajas concentraciones la enzima mantiene un nivel de actividad por debajo del 100%, sin embargo, conforme la concentración aumenta, la actividad de la enzima se ve beneficiada.

Para el caso del SDS, la actividad de la enzima seguiría un camino opuesto al del anterior caso. No solo la enzima no conserva el 100% de su actividad a bajas concentraciones, si no que conforme la concentración aumenta, pierde actividad.

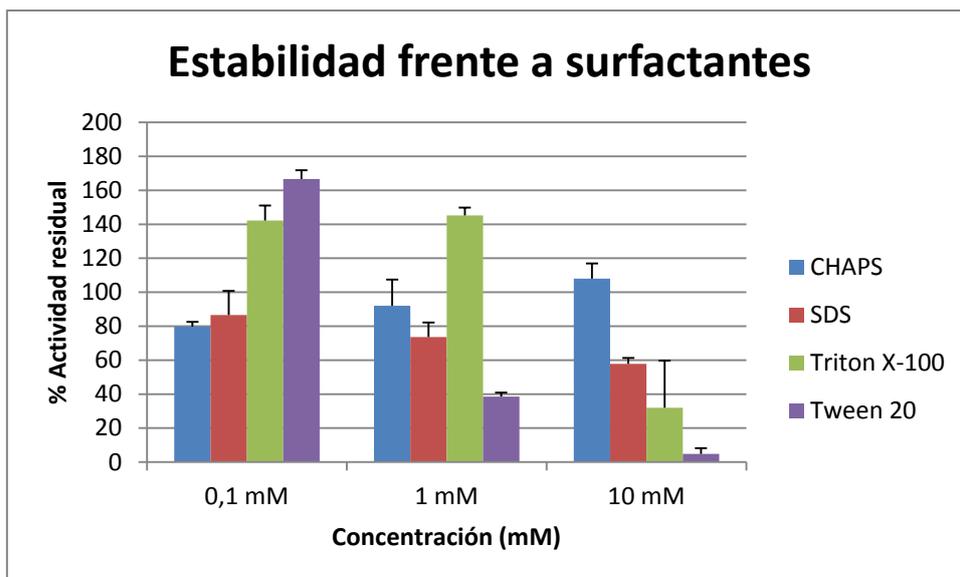


Figura 7: Influencia de distintas concentraciones de agentes surfactantes sobre la actividad de la lipasa en forma de % de actividad residual.

En los casos del Tween 20 y del Triton X 100 la actividad de la enzima se ve especialmente beneficiada a bajas concentraciones de los agentes surfactantes, alcanzando el máximo de actividad (un 160%) con el Tween 20 a 0,1 mM. Al incrementar la concentración podemos ver como la actividad se ve afectada, de una manera especialmente drástica en el caso del Tween 20, reduciéndose la actividad por debajo del 40% ya a una concentración de 1 mM.

Si lo comparamos con el trabajo llevado a cabo por Royter y colaboradores (Royter et al., 2009) coincidimos en que el CHAPS también produce una ligera activación para las lipasas de su trabajo, mientras que la presencia del resto de agentes provoca una disminución de la actividad de las lipasas conforme se incrementa la concentración.

- Determinación de la estabilidad frente a detergentes comerciales:

Se probó la estabilidad de la enzima frente a 4 detergentes comerciales distintos: Dixan Aromaterapia, Jabón de Marsella de Eroski, Vanish Oxiaction y Somat 8 acciones. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8.

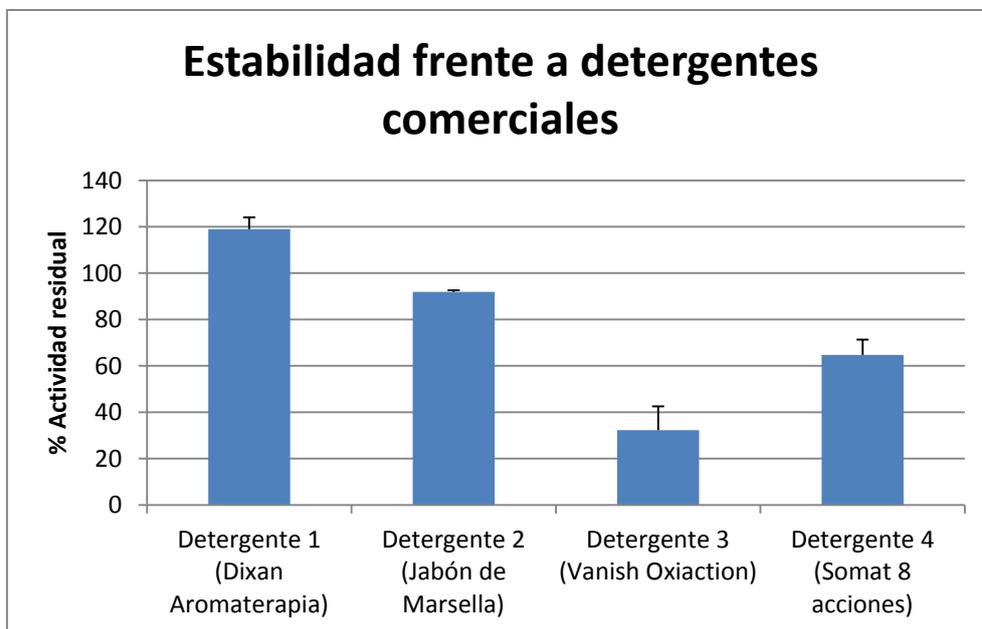


Figura 8: influencia de 4 detergentes comerciales distintos sobre la actividad de la lipasa.

Se puede observar en la Figura 8 que, de los cuatro detergentes ensayados, la enzima muestra mejor compatibilidad con los líquidos (detergentes 1 y 2), siendo el Dixan Aromaterapia con el que la actividad de la enzima se incrementa hasta cerca del 120%. En el otro extremo encontramos al Vanish Oxiaction, quedando por debajo del 40%.

Para poner los datos obtenidos en perspectiva, en experimentos similares como el desarrollado por Benmrاد y colaboradores (Omrane Benmrاد et al., 2016), o el llevado a cabo por Cherif y colaboradores (Cherif et al., 2011), en los que testan la compatibilidad de sus enzimas con distintos detergentes comerciales entre los cuales hay detergentes de la marca Dixan, sus enzimas mantienen el 100% de su actividad (Omrane Benmrاد et al., 2016) o se ve ligeramente reducida (Cherif et al., 2011), mientras que para la lipasa del presente trabajo, su actividad se vio beneficiada.

En base a los resultados obtenidos en este experimento, se seleccionó el Dixan Aromaterapia como el detergente a utilizar con la lipasa para la prueba de determinación de la capacidad para eliminar manchas.

- Determinación de la capacidad para eliminar manchas:

Para este experimento se busca determinar la capacidad de la enzima para eliminar manchas de grasa en tejidos. Habiéndolo preparado de la manera que se indica en el apartado de Material y Métodos, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 9.

En la figura 9 podemos ver claramente como el detergente se beneficia de la presencia de la lipasa a la hora de eliminar manchas de grasa en las piezas de algodón. El vaso con agua es el que menos capacidad de eliminación de manchas tiene, como era de esperar. Por su parte, el detergente solo, fue capaz de eliminar algo de la mancha, y sin lugar a dudas los mejores resultados se consiguieron para los casos en los que la lipasa estaba presente.

En este experimento destaca el hecho de que, aunque la temperatura óptima para el funcionamiento de la lipasa es 75°C, se consiguieron unos resultados muy buenos realizando el lavado de las piezas de algodón en agua fría.

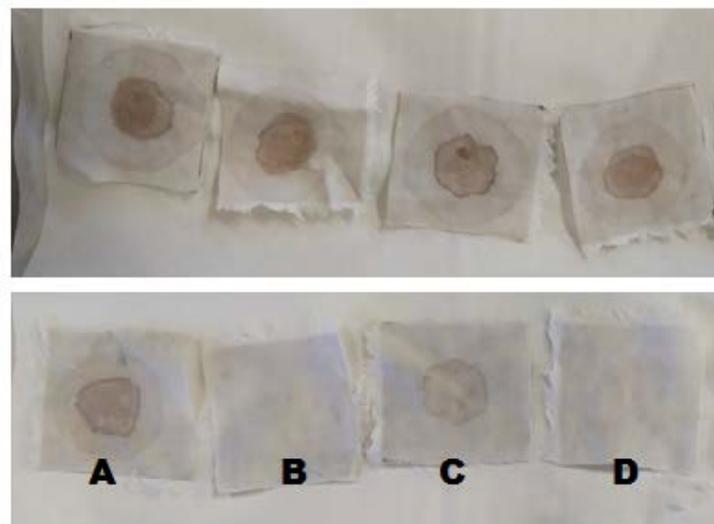


Figura 9: Antes (foto superior) y después (foto inferior) del lavado para las cuatro piezas de algodón lavadas con agua (A), detergente + lipasa (B), detergente (C) y detergente con las enzimas inactivadas + lipasa (D).

5. Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- A pesar de la gran cantidad de pruebas ensayadas, por el momento, no se ha obtenido ningún clon de levadura que exprese la endocelulasa CelB4 aislada de una fuente termal mediante metagenómica funcional.

- La lipasa LipD11 obtenida a partir de una metagenoteca de aguas termales y expresada heterológicamente en levaduras presenta un 20% de actividad tras 15 minutos de incubación a 90°C. Su temperatura óptima es de 75°C y posee preferencia por ácidos grasos de 8 átomos de carbono. Los compuestos químicos NiCl₂ y MgCl₂ ejercen poco efecto sobre la actividad lipolítica, mientras que el MnCl₂ y el ZnSO₄ hacen disminuir la actividad a concentraciones elevadas (10 mM). Los surfactantes Triton X-100 y Tween 20 incrementan la actividad lipolítica a bajas concentraciones (0,1 mM) mientras que a altas concentraciones (10 mM) disminuyen la actividad. Además la enzima presenta actividad incrementada en presencia de determinados detergentes como Dixan Aromaterapia y se ha demostrado eficaz a la hora de eliminar manchas de grasa en tejidos de algodón usando agua del grifo sin calentar ni atemperar. Por todo ello, se podría afirmar que es una enzima de interés para utilizar en formulaciones de detergentes comerciales.

6. Bibliografía

- Arshad, Z. I. M., Amid, A., Yusof, F., Jaswir, I., Ahmad, K., & Loke, S. P. (2014). Bromelain: An overview of industrial application and purification strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(17), 7283–7297. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5889-y>
- Bernfeld, P. (1951). Amylases α and β . *Methods in Enzymes*, 144–147.
- Cadena, E. M. (2009). Estudio del refinado de pastas de papel utilizando métodos biotecnológicos (enzimas). In *Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Textil y Papelera. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial y Aeronáutica de Tarrasa. Universidad Politécnica de Cataluña. Tarrasa, España.*
- Cherif, S., Mnif, S., Hadrich, F., Abdelkafi, S., & Sayadi, S. (2011). A newly high alkaline lipase: an ideal choice for application in detergent formulations. *Lipids in Health and Disease*, 10, 221. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-221>
- Dekker, P. J. T., Koenders, D., & Bruins, M. J. (2019). Lactose-free dairy products: Market developments, production, nutrition and health benefits. *Nutrients*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/nu11030551>
- Fernández-Lucas, J., Castañeda, D., & Hormigo, D. (2017). New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. In *Trends in Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.017>
- Fore Jr, J., Wiechers, I. R., & Cook-Deagan, R. (2006). The effects of business practices, licensing, and intellectual property on development and dissemination of the polymerase chain reaction: case study. *Journal of Biomedical Discovery and Collaboration*, 1(7). <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.1186%2F1747-5333-1-7>
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2017). Cheese: Historical Aspects. In *Fundamental of Cheese Science* (1st ed., pp. 1–10). Springer, Boston, MA. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_1
- Fuciños, P., Abadín, C. M., Sanromán, A., Longo, M. A., Pastrana, L., & Rúa, M. L. (2005). Identification of extracellular of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB27: Partial purification and preliminary biochemical characterization. *Journal of Biotechnology*, 3(117), 233–241. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.01.019>
- Hatti-Kaul, R. (2009). Enzyme Production. In M. Doelle, Horst W; Rokem, J. Stefan; Berovic (Ed.), *Biotechnology - Volume V: Fundamentals in Biotechnology* (pp. 21–63). EOLSS Publications. https://books.google.es/books/about/BIOTECHNOLOGY_Volume_V.html?id=eW55DAAAQBAJ&redir_esc=y
- Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., Afzal, M., Kouser, A., & Nadeem, H. (2018). Bacterial lipases: A review on purification and characterization. In *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014>
- Knapik, K., Becerra, M., & González-Siso, M.-I. (2019). Microbial diversity analysis and screening for novel xylanase enzymes from the sediment of the Lobios Hot Spring in Spain. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47637-z>

- Li, H., & Zhang, X. (2005). Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1. *Protein Expression and Purification*, 42, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.03.011>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2018). *Lehninger - Principles of Biochemistry* (W. H. Freeman (ed.); 7th ed.).
- Nobel Prize Organisation. (2019). *Kary B. Mullis - Facts - NobelPrize.org*. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/mullis/facts/>
- Omrane Benmrad, M., Moujehed, E., Ben Elhouli, M., Zraï Jaouadi, N., Mechri, S., Rezik, H., Kourdali, S., El Hattab, M., Badis, A., Sayadi, S., Bejar, S., & Jaouadi, B. (2016). A novel organic solvent- and detergent-stable serine alkaline protease from *Trametes cingulata* strain CTM10101. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 961–972. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.025>
- Patel, A. K., Singhania, R. R., Sim, S. J., & Pandey, A. (2019). Thermostable cellulases: Current status and perspectives. In *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.049>
- Payen, A., & Persoz, J. F. (1833). Memoir on diastase, the principal products of its reactions, and their applications to the industrial arts. *Annales de Chimie et de Physique*, 2nd(53), 73–92. https://books.google.es/books?id=Q9I3AAAAMAAJ&pg=PA73&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Polaina, J., & MacCabe, A. P. (2007). Industrial enzymes: Structure, function and applications. In *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. <https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0>
- Potprommanee, L., Wang, X. Q., Han, Y. J., Nyobe, D., Peng, Y. P., Huang, Q., Liu, J. Y., Liao, Y. L., & Chang, K. L. (2017). Characterization of a thermophilic cellulase from *Geobacillus* sp. HTA426, an efficient cellulase-producer on alkali pretreated of lignocellulosic biomass. *PLoS ONE*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175004>
- Rodríguez Alegría, M. E., & Castillos Rosales, E. (2014). Enzimas aplicadas en procesos industriales. *Revista Digital Universitaria*, 15(11). <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art96/#>
- Royter, M., Schmidt, M., Elend, C., Höbenreich, H., Schäfer, T., Bornscheuer, U. T., & Antranikian, G. (2009). Thermostable lipases from the extreme thermophilic anaerobic bacteria *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* SOL1 and *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *tengcongensis*. *Extremophiles*, 13(5), 769–783. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0265-z>
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., & Vandamme, E. J. (1993). Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications. *Advances in Applied Microbiology*, 39(C), 213–294. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70597-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70597-5)

- Shariff, F. M., Rahman, R. N. Z. R. A., Basri, M., & Salleh, A. B. (2011). A newly isolated thermostable lipase from bacillus sp. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms12052917>
- Sigma Aldrich. (n.d.). *N-Terminal YEpFLAG-1 - Sigma-Aldrich*. Retrieved January 13, 2020, from <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Vector/e9020vec.pdf>
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. In *3 Biotech*. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>
- ThermoFisher Scientific - UK. (n.d.). *CloneJET PCR Cloning Kit*. Retrieved January 13, 2020, from <https://www.thermofisher.com/es/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-molecular-cloning/clonejet-pcr-cloning-kit.html>
- Zitomer, R. S., & Hall, D. (1976). Yeast Cytochrome c Messenger. *The Journal of Biological Chemistry*, *251*(20), 6320–6326.