

**CURSO
2017/18**

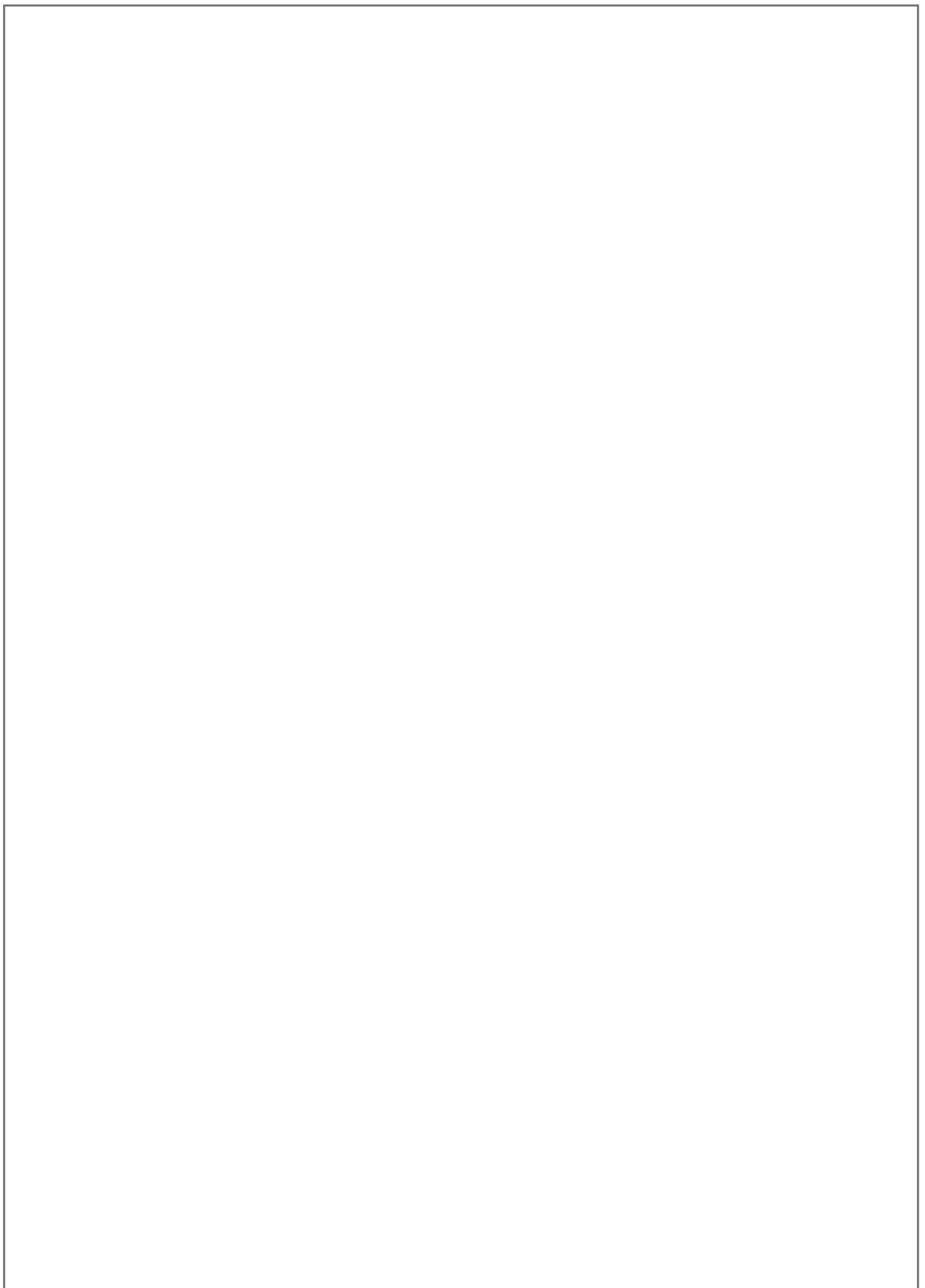
Caracterización bioquímica de una lipasa obtenida a partir de una metagenoteca de aguas termales.

Caracterización bioquímica dunha lipasa obtida a partir dunha metaxenoteca de augas termais.

Biochemical characterization of a lipase obtained from a hot spring metagenomic library.



Natalí García Marnotes





UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Caracterización bioquímica de una lipasa obtenida a partir de una metagenoteca de aguas termales.

Caracterización bioquímica dunha lipasa obtida a partir dunha metaxenoteca de augas termais.

Biochemical characterization of a lipase obtained from a hot spring metagenomic library.

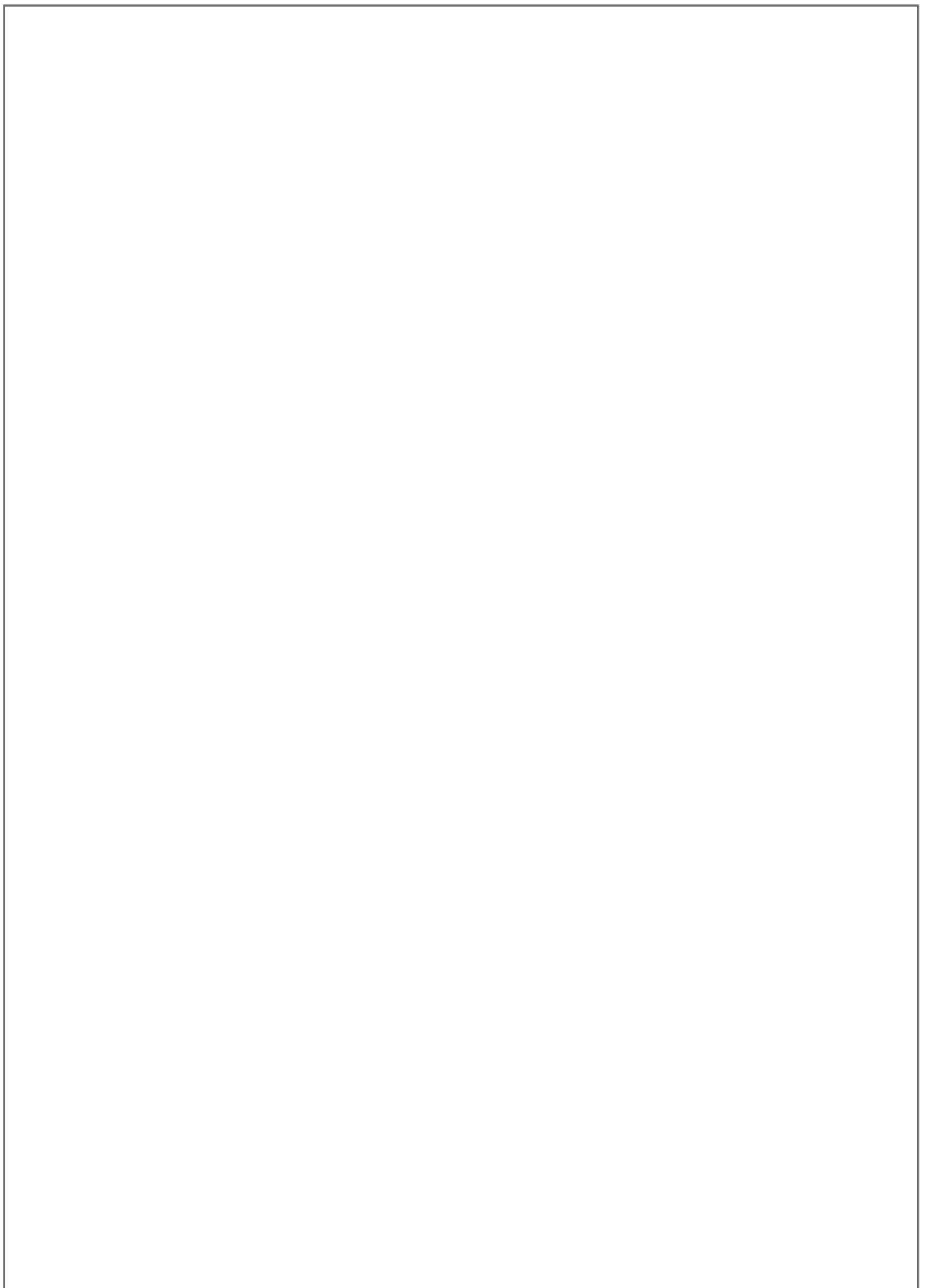
Trabajo de Fin de Máster en Biotecnología Avanzada realizado por:

Natalí García Marnotes

Dr. Manuel Becerra Fernández en calidad de tutor autoriza la presentación del trabajo de fin de máster “Caracterización bioquímica de una lipasa obtenida a partir de una metagenoteca de aguas termales” realizado por Dña. Natalí García Marnotes para su defensa ante el tribunal evaluador.

En A Coruña, a 2 de Febrero del 2018

Firmado:



ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN/RESUMO/ABSTRACT

ANEXO I: ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN

- a. Las enzimas y su importancia a nivel industrial 1
- b. Enzimas lipolíticas: tipos, estructura, función y clasificación 1-3
- c. Microorganismos y sus enzimas: enzimas termoestables 3-4
- d. Aplicaciones de las enzimas lipolíticas 4-5
- e. Metagenómica 5-6
- f. Metagenómica de aguas termales 6-7

2. OBJETIVO 8

3. MATERIAL Y MÉTODOS

- a. Material biológico
 - i. Cepa bacteriana 8
 - ii. Vector de clonación 8
- b. Medida de la concentración proteica 9
 - i. Método de Bradford
- c. Determinación de la actividad enzimática 9-10
 - i. Actividad lipolítica
- d. Caracterización bioquímica de LIPD11 10
 - i. Especificidad de sustrato 10
 - ii. Actividad lipolítica en función del pH 11
 - iii. Actividad lipolítica en función de la temperatura 11
 - iv. Termoestabilidad 11
 - v. Efecto de detergentes, solventes orgánicos y otros agentes químicos 11
 - vi. Cinética enzimática 11
- e. Técnicas electroforéticas 11-12
 - i. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturizantes (SDS-PAGE)
- f. Métodos de tinción y detección de proteínas 12
 - i. Tinción con Azul de Coomassie de geles SDS-PAGE

g. Concentración de proteínas	12
i. Concentración con dispositivos Amicon (Millipore)	
h. Método de manipulación de proteínas	12-13
i. Desglicosilación con EndoH	
i. Herramientas bioinformáticas	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
a. Medida de la concentración proteica	14
b. Especificidad de sustrato	14
c. Cinética enzimática	15
d. Efecto de la temperatura y el pH en la actividad	15-16
e. Estabilidad térmica	17
f. Efecto de detergentes, solventes orgánicos y diversos reactivos	17-18
g. Detección de proteínas	19
h. Tratamiento con EndoH	19
i. Herramientas bioinformáticas	20
5. CONCLUSIONES	21
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22-25

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi tutor, el Dr. Manuel Becerra Fernández, por acogerme, por los consejos y conocimientos brindados en todo momento, siempre dispuesto a darme su ayuda.

A todos los compañeros del Laboratorio de Bioquímica y Biología Celular, por su cariño y compañerismo.

A las biólogas compañeras de laboratorio y de carrera, sin las cuales toda esta etapa de mi vida sería diferente.

A mis amigos, por la fuerza y los ánimos transmitidos durante todo el máster y la carrera.

A Paulo, por estar a mi lado siempre, calmar mis ánimos y hacer que sea más positiva.

Y a mi familia en general, por acompañarme a lo largo del camino, con apoyo y confianza; con especial hincapié en mi padre y mi madre, sin los cuales no podría haber realizado ni la mitad de mis estudios, y para finalizar pero no menos importante, a mi hermano por su confianza y sus palabras siempre de ánimo.

A todos los que han estado en mi vida a lo largo de esta etapa tan importante,

Gracias de corazón.

RESUMEN / RESUMO / ABSTRACT

Los microorganismos que habitan ambientes extremos como las aguas termales son de un elevado interés industrial, ya que sus enzimas son *a priori* termoestables, y por tanto presentan características favorables para su uso a nivel industrial. Para poder obtener dichas enzimas se recurre a la metagenómica, que aísla el ADN ambiental y lo expresa en un microorganismo modelo. Así se ha encontrado LIPD11, una enzima lipolítica descubierta por primera vez en una metagenoteca de aguas termales de Río Caldo, Lobios (Ourense), que se ha caracterizado bioquímicamente. En este trabajo hemos podido confirmar que se trata de una esterasa, ya que presenta especificidad hacia ácidos grasos de cadena menor de 10 átomos de carbono y su cinética enzimática se ajusta a la de Michaelis-Menten. Presenta un incremento de actividad en presencia de los surfactantes Tween 80, Tween 20 y Triton x100 así como en presencia de EDTA, mientras que disminuye su actividad en presencia de diferentes iones y distintos solventes orgánicos. Mantiene el 50% de su actividad tras una hora de incubación a 70°C. Su temperatura óptima es de 60°C y el pH óptimo de 8.5. El peso molecular calculado a partir de una electroforesis en gel de SDS-PAGE es de 32 kDa y parece no presentar glicosilaciones. La predicción de la estructura terciaria encaja con el plegamiento representativo de las enzimas de la familia α/β hidrolasas.

Palabras clave: metagenómica, aguas termales, enzima lipolítica, LIPD11

Os microorganismos que habitan ambientes extremos como as augas termais son dun elevado interese industrial, xa que as súas enzimas son termoestables *a priori* e, polo tanto, teñen características favorables para o uso industrial. Para obter estas enzimas, utilízase a metaxenómica, que aílla o ADN ambiental e expresao nun microorganismo modelo. Así atopouse a LIPD11, unha enzima lipolítica descuberta por primeira vez nunha metaxenoteca de augas termais do Río Caldo, Lobios (Ourense), que se caracterizou bioquímicamente. Neste traballo puidemos confirmar que se trata dunha esterasa, xa que presenta especificidade para ácidos graxos con menos de 10 átomos de carbono e a súa cinética enzimática axústase á de Michaelis-Menten. Presenta un aumento da actividade en presenza dos tensoactivos Tween 80, Tween 20 e Triton x100, así como na presenza de EDTA, mentres que a súa actividade diminúe na presenza de diferentes ións e diferentes disolventes orgánicos. Mantén o 50% da súa actividade despois dunha hora de incubación a 70°C. A súa temperatura óptima é de 60° C e o pH óptimo de 8,5. O peso molecular calculado a partir dunha electroforesis en xel SDS-PAGE é de 32 kDa e non parece presentar glicosilacións.

A predición da estrutura terciaria encaixa co plegamento representativo das enzimas da familia α / β hidrolasas.

Palabras chave: metaxenómica, augas termais, enzimas lipolíticas, LIPD11

Microorganisms that inhabit extreme environments such as thermal waters are of high industrial interest, since their enzymes are *a priori* thermostable, and therefore have favorable characteristics for industrial use. In order to obtain these enzymes, metagenomics is used, which isolates environmental DNA and expresses it in a model microorganism. This is how LIPD11, a lipolytic enzyme discovered for the first time in a hot spring metagenomic library from Río Caldo, Lobios (Ourense), was found and it has been characterized biochemically. In this work, we have been able to confirm that it is an esterase, since it presents specificity to fatty acids of less than 10 carbon atoms and its enzymatic kinetics is adjusted to a Michaelis-Menten. It presents an increase in activity in the presence of the surfactants Tween 80, Tween 20 and Tritone x100 as well as in the presence of EDTA, while its activity decreases in the presence of different ions and different organic solvents. It maintains more than 50% of its activity after one hour of incubation at 70°C. Its optimum temperature is 60°C and the optimal pH 8.5. The molecular weight calculated from SDS-PAGE gel electrophoresis is 32 kDa and does not appear to present glycosylations. The prediction of the tertiary structure fits well with the representative folding of the enzymes of the α / β hydrolases family.

Keywords: metagenomic library, hot springs, lipolytic enzyme, LIPD11

ANEXO I : ABREVIATURAS

Abs: absorbancia

Ac: ácido

ADN: ácido desoxirribonucléico

Asn: asparagina

Asp: ácido aspártico

Ba: bares

BSA: Suero Bovino Fetal

Ca²⁺: iones calcio

CaCl₂: cloruro cálcico

CM-trp: medio completo – triptófano

DTT: 1,4-ditiotreitol

E : coeficiente de extinción molar

EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético

Glc: Glucosa

Gly: glicina

HCl: ácido clorídrico

h: hora

His: histidina

k: constante térmica de desactivación

K: kilo

KDa: kilo daltons

Km: constante de Michaelis-Menten

LA: Actividad lipolítica

LA₀: Actividad lipolítica inicial

M: molar

Man: Manosa

min: minutos

mL: mililitros

mM: milimolar

Mw: Peso molecular

N: asparagina

Na₂CO₂: carbonato de sódio

nm: nanómetros

pI: Punto isoelectrico

Pro: prolina

r.p.m.:revoluciones por minuto

SDS: dodecilsulfato sódico

Ser: serina

t: tiempo

Thr: treonina

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

U: unidades de actividad enzimática

V: Voltaje

Vmax: Velocidad máxima de reacción

X: cualquier aminoácido

°C: grados centígrados

μmol: micromol

μL: microlitro

1. INTRODUCCIÓN

a. Las enzimas y su importancia a nivel industrial

Las enzimas son biocatalizadores que poseen especificidad, eficiencia y modo de regulación, por lo que se utilizan en procesos biotecnológicos. Esto supone respecto a la catálisis química mayor selectividad y condiciones de reacción más favorables para el medio ambiente con un menor coste de energía, por lo tanto, su uso puede suponer ganancias de millones de dólares (Rabbani *et al.*, 2015; Bhosale *et al.*, 2016; Tiwari, 2016; Khan *et al.*, 2017). Sin embargo, el precio sigue siendo un inconveniente para su implementación total en la industria en comparación con los métodos convencionales. Su utilización va a depender de un factor clave que es la estabilidad de las enzimas, la duración de sus niveles de actividad operativa (Godoy, 2017).

Las lipasas son un tipo de enzimas que presentan especial interés debido a su versatilidad, pueden catalizar tanto reacciones de hidrólisis como síntesis, siendo ya empleadas en diversas aplicaciones biotecnológicas. Esto implica que en el escenario del mercado actual las lipasas se posicionan en el tercer puesto después de proteasas y amilasas en el que se cree que se destinarán aproximadamente 590,5 millones de dólares en 2020 (Bhosale *et al.*, 2016).

Los procesos industriales donde operan lipasas y esterases suelen tener temperaturas de reacción relativamente altas (45°C) y condiciones de pH alcalino, por lo tanto, se buscan lipasas que soporten tales condiciones. Las características de las enzimas termófilas, estables a altas temperaturas y en solventes orgánicos, con una amplia especificidad de sustrato y una alta selectividad regional, hacen que estas sean los biocatalizadores ideales (Sayer *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015; Bhosale *et al.*, 2016).

b. Enzimas lipolíticas: tipos, estructura, función y clasificación

Las **enzimas lipolíticas**, incluidas las esterases y las “lipasas verdaderas”, pertenecen a la clase general de las hidrolasas de ésteres carboxílicos (EC 3.1.1), que catalizan la hidrólisis y formación de enlaces éster de triacilglicerol (en la interfaz entre un sustrato

insoluble y agua), esterificación, transesterificación, interesterificación y aminólisis en entornos no acuosos (Kanmani *et al.*, 2015) (**Figura 1**).

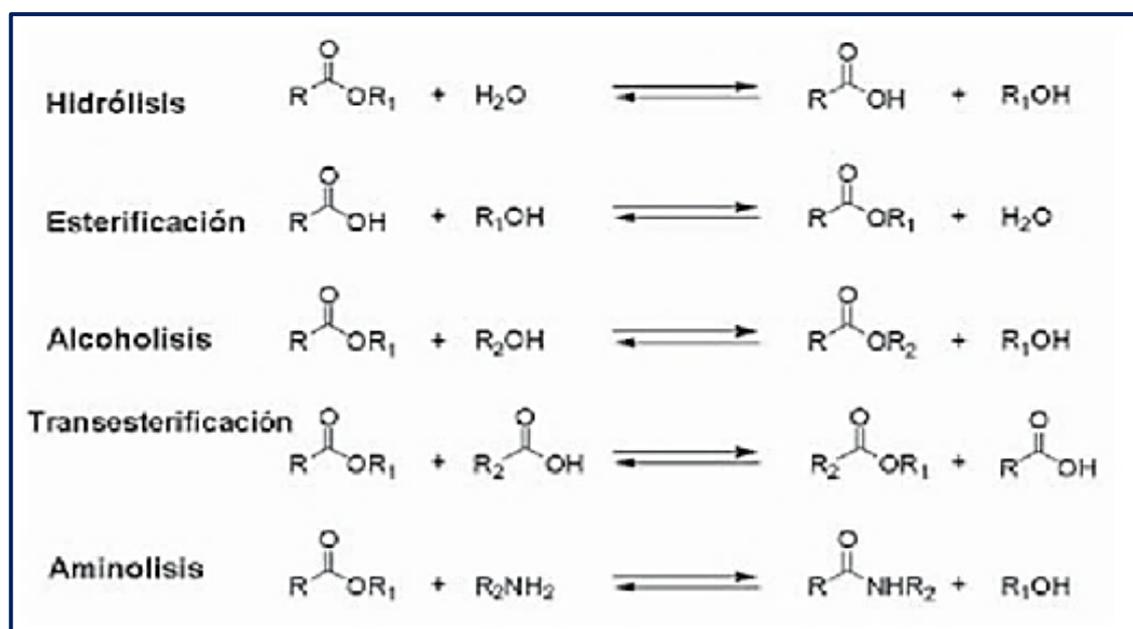


Figura 1: Reacciones catalizadas por enzimas lipolíticas. Tomado de: Biotecnología blanca e industria farmacéutica - Scientific Figura en Research Gate. Disponible: https://www.researchgate.net/39482094_fig3_FIGURA-3-Reacciones-de-hidrolisis-sintesis-y-de-transferencia-de-grupos-catalizadas-por [acceso 12 Dic, 2017]

La **distinción** entre lipasas y carboxilesterasas se puede realizar mediante la especificidad del sustrato: las esterasas (EC 3.1.1.1, carboxil éster hidrolasas) hidrolizan ésteres solubles, en agua o emulsionados, con ácidos carboxílicos de cadena corta (<10 átomos de carbono), y las lipasas “verdaderas” (EC 3.1.1.3, triacilglicerol hidrolasas) prefieren ácidos grasos de cadena larga (≥ 10 átomos de carbono). Además, sólo las lipasas muestran activación interfacial, que consiste en la presencia de una tapa hidrofóbica que cubre el centro activo en la conformación inactiva de la enzima. En la conformación abierta el centro activo es accesible para el sustrato y la enzima está activa. La transición de formas cerradas a abiertas ocurre en presencia de una interfase lipídica o una emulsión de sustrato que abre la tapa, como consecuencia de lo cual se activa la enzima, lo que aumenta drásticamente su actividad. Las esterasas, sin embargo, siguen el comportamiento cinético clásico de Michaelis-Menten (Jaeger *et al.*, 1999; Bornscheuer, 1999; Fojan *et al.*, 2002).

Ambos tipos de enzimas lipolíticas tienen su **centro activo** formado por una tríada catalítica altamente conservada, compuesta de residuos de Ser, Asp e His. La serina catalítica es parte del pentapéptido (Gly-X-Ser-X-Gly). Ambas pertenecen a la familia α/β -hidrolasas con una hoja β central, que contiene la serina activa colocada en un bucle denominado codo catalítico (**Figura 2**). Para obtener la gran variedad de enzimas α/β -hidrolasas, se agregan diferentes dominios adicionales a la estructura central que son responsables de las diferencias en las actividades enzimáticas dentro del pliegue global (Khan *et al.*, 2017; Piscitelli *et al.*, 2017; Shahinyan *et al.*, 2017).

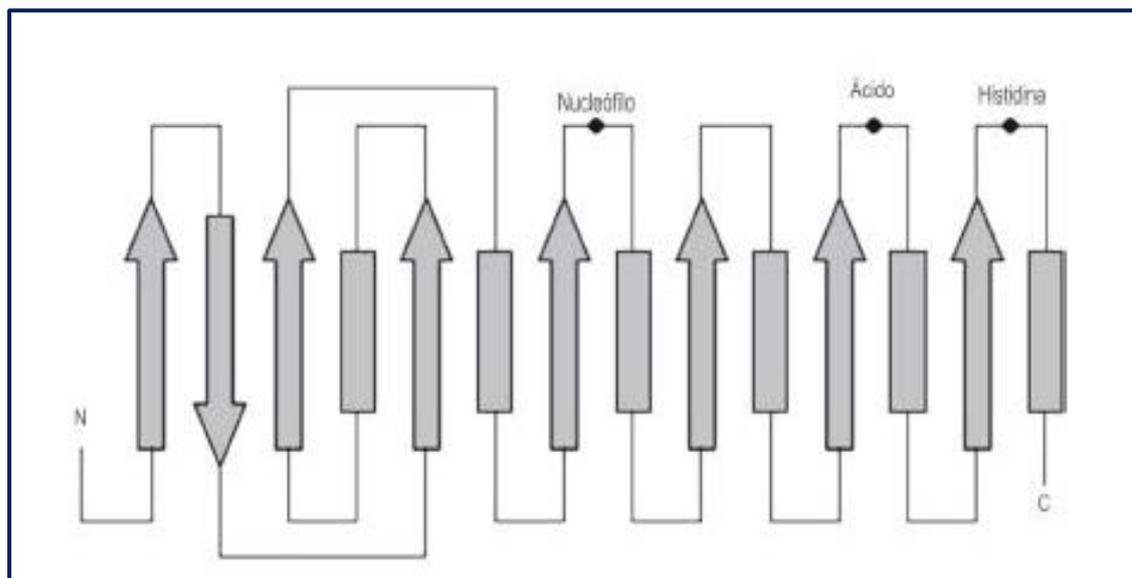


Figura 2: Diagrama esquemático del plegamiento de las enzimas α/β -hidrolasas, presente en el dominio catalítico canónico de las lipasas. Flechas = cadenas β , rectángulos = hélices α , conexiones = lazos, puntos = residuos que componen la tríada catalítica, N y C = extremos amino y carboxilo terminal. Recogido en González-Baceiro *et al.*, 2010.

Su **función biológica** es la hidrólisis de los triglicéridos en diglicéridos, monoglicéridos, glicerol y ácidos grasos. Se encuentran presentes en animales y plantas, así como en hongos y bacterias (Gupta *et al.*, 2014).

c. Microorganismos y sus enzimas : enzimas termoestables

Las **bacterias** producen enzimas lipolíticas de mucho interés, ya que son altamente versátiles, capaces de catalizar una gran variedad de reacciones hidrolíticas y sintéticas. No

necesitan cofactores, son estables, activas en solventes orgánicos, con un corto tiempo de generación, capacidad de manipulación genética, escalado, purificación y son quimioselectivas, regioselectivas y enantioselectivas (Shao *et al.*, 2013). Además, muestran mayor termoestabilidad y tolerancia a los reactivos desnaturalizantes y/o disolventes orgánicos en comparación con las lipasas fúngicas y de levadura (Schmidt-Dannert *et al.*, 1996; Haki & Rakshit, 2003; Shahinyan *et al.*, 2017; Shao *et al.*, 2013; Soleymani *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017).

Aún son más interesantes los **microorganismos termófilos**, que viven en ambientes con temperaturas extremadamente altas ya que producen **enzimas termoestables**. La disponibilidad de estas enzimas termófilas está abriendo nuevos horizontes en una variedad de procesos biocatalizados que se realizan en condiciones extremas. Las reacciones de catálisis enzimática llevadas a cabo a mayor temperatura conducen a una mayor velocidad de difusión, aumentan la solubilidad de los lípidos y otros sustratos hidrófobos en el agua y pueden reducir el riesgo de contaminación, suponiendo esto que son óptimas para procesos biotecnológicos (Jaeger & Eggert 2002; Haki & Rakshit, 2003; Gupta *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2016).

Ya se han descrito y caracterizado varias **lipasas termoestables** en especies termófilas como: *Geobacillus thermoleovarans* ID-1 (Lee *et al.*, 1999), *Geobacillus stearothermophilus* L1 (Kambourova *et al.*, 2003), *Geobacillus zalihae* (Rahman *et al.*, 2007), *Geobacillus* sp. TW1 (Li & Zhang, 2005) y *Anoxybacillus kamchatkensis* KW 12. (Olusesan *et al.*, 2009; Koc *et al.*, 2015).

d. Aplicaciones de las enzimas lipolíticas

Las **aplicaciones** de las reacciones que pueden ser catalizadas por las enzimas lipolíticas son múltiples y muy diversas:

- En la industria alimentaria permiten: producir ésteres aromatizantes y del sabor, ésteres de azúcar que actúan como emulsionantes, modificar la composición de ácidos grasos de los triglicéridos mediante la introducción de omega-3 y/o eliminar los ácidos grasos saturados (Nagarajan, 2012; Adlercreutz, 2013).

- En la industria farmacéutica se utilizan para resolver mezclas racémicas usadas en la síntesis de fármacos y para producir enantiómeros biológicamente activos (Bornscheuer, 1999, Sharma *et al.*, 2012; Adlercreutz, 2013).
- En la industria cosmética y de perfumería se usan para producir por esterificación mono- y diacilgliceroles que se emplean como surfactantes y compuestos responsables del aroma (Sharma & Kanwar, 2014).
- En la industria del papel permiten eliminar las resinas de la pasta de papel (Sharma *et al.*, 2012).
- En la industria de los detergentes se usan como aditivos para eliminar las manchas de grasa (Sharma *et al.*, 2012).
- En el diagnóstico clínico se pueden emplear como biomarcadores para detectar pancreatitis o infección tuberculosa (Sharma *et al.*, 2012).
- En ensayos analíticos para secuencias de ADN específicas se pueden utilizar como genes indicadores acoplados con sustratos cromogénicos (Nagarajan, 2012).
- En la producción de biodiesel se emplean como una alternativa a la catálisis química alcalina que es nociva para el medio ambiente, mediante la transesterificación de aceites en metanol u otro alcohol diferente y producir ésteres alquílicos de ácidos grasos (Adlercreutz, 2013).
- Se usan en la síntesis de biopolímeros a partir de monómeros estructuralmente complejos (Nagarajan, 2012).
- Finalmente, se pueden usar en tratamiento de residuos y biorremediación de derrames de petróleo (Sharma *et al.*, 2012).

e. Metagenómica

La metagenómica proporciona una poderosa herramienta para explorar la biodiversidad de enzimas en la naturaleza, ya que se sabe que las enzimas de la mayoría de microorganismos que no tienen condiciones de cultivo adecuadas en laboratorio (99% del total) no pueden ser identificadas a través de otros métodos. La clonación y el análisis del ADN ha llevado a la identificación de varios genes que codifican para enzimas desconocidas y valiosas. La tecnología basada en metagenómica implica el aislamiento del ADN ambiental, la construcción de una biblioteca mediante la clonación del ADN en un vector de inserción y el posterior cribado. Esto se realiza bajo el control de promotores fuertes para sobreexpresar las enzimas en organismos mesófilos, que son de crecimiento más rápido y

más fáciles de cultivar que los termófilos. Además, el sistema para la expresión heteróloga puede conducir a la secreción de la enzima en el medio de cultivo, lo que facilita su procesamiento y purificación. La bacteria *Escherichia coli* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* son los microorganismos empleados con mayor frecuencia para producir proteínas recombinantes a gran escala. Existen cepas genéticamente modificadas de *S. cerevisiae* que se han mejorado para la secreción de proteínas recombinantes (Jaeger & Eggert 2002; Haki & Rakshit, 2003; Gupta *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2016).

Existen dos enfoques en metagenómica, dependiendo del método de detección que se utilice para descubrir los nuevos genes. Uno es el cribado basado en secuencias, que se basa en el uso de una secuencia de ADN conservada para diseñar un cebador o sonda específica que detecta secuencias. Sin embargo, tiende a recuperar secuencias relacionadas con genes conocidos y no selecciona secuencias genéticas completas. El otro es el cribado funcional, que depende de la detección de un fenotipo específico expresado por el gen de interés. La limitación de este método es la dificultad asociada con la producción de enzimas utilizando un sistema de expresión de genes heterólogos, porque no todas las proteínas se pueden expresar con éxito.

A pesar de los inconvenientes antes mencionados, se han descubierto varias enzimas lipolíticas a través del enfoque metagenómico de diversas muestras ambientales, incluidos suelos, estanques, agua de lagos, aguas termales y sedimentos marinos. Estas enzimas tienen un uso potencial y han ampliado nuestro conocimiento sobre la diversidad de las enzimas lipolíticas (Leis *et al.*, 2015; Shao *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2016).

f. Metagenómica de aguas termales

Las aguas termales son hábitats naturales de microorganismos termófilos. Las características de las termoenzimas de resistencia a la presencia de disolventes orgánicos, valores extremos de pH e iones metálicos hacen que destaquen como biocatalizadores robustos y versátiles (Bornscheuer, 1999; Liu *et al.*, 2017).

La región gallega, en el noroeste de España, alberga una gran cantidad de agua mineral de origen meteorológico. El agua de lluvia desciende por fracturas en el subsuelo y circula cambiando su composición química y temperatura antes de que emerja en

manantiales naturales. Muchos de estos manantiales, localizados en fracturas grandes y profundas, calientan el agua circulante a altas temperaturas. Se han aislado varios microorganismos termófilos de estas aguas termales gallegas, se han cultivado y se han utilizado para producir enzimas lipolíticas que se han caracterizado (Deive *et al.*, 2013).

Para este trabajo elegimos la fuente termal Río Caldo, cerca de Lobios (Ourense) debido a su alta temperatura (77°C) y pH alcalino (8.2) (**Figura 3**). Se parte de una biblioteca metagenómica generada a partir del agua de esta fuente termal, utilizando el fósido pCC1FOS. El ADN utilizado para construir la metagenoteca se secuenció y las lecturas se ensamblaron y analizaron para dibujar la diversidad microbiana capturada en la biblioteca de Lobios. La biblioteca metagenómica se sometió a un cribado funcional de la actividad lipolítica mediante búsqueda funcional, añadiendo como sustrato tributirina en las placas de cultivo. Se obtuvo un clon positivo que posteriormente fue subclonado en el plásmido YEpFLAG-1 (López-López *et al.*, 2015) y expresado usando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 como hospedador heterólogo. El plásmido YEpFLAG-1 presenta una señal de secreción (**Figura 4**) que dirige a la lipasa (LIPD11) hacia el medio extracelular. Se utilizó el ultrafiltrado del medio de cultivo, disponible en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la UDC, para la caracterización bioquímica de la enzima.



Figura 3: Fotografía del sitio de recogida de la muestra termal de dónde se aisló la lipasa en estudio junto con la localización en el mapa de Galicia. Fuente: <https://passport2happiness.wordpress.com/2013/09/08/the-natural-spa-lobios-and-rio-caldo/>

2. OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo es la caracterización bioquímica de una lipasa termófila (LIPD11) obtenida a partir de una metagenoteca de aguas termales (Río Caldo/Ourense) expresada heterológamente en *S. cerevisiae* BJ3505.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Cepa bacteriana

S. cerevisiae BJ3505 es la cepa que se ha usado como hospedador para expresar la lipasa termófila heterológamente al medio extracelular. Esta cepa se adquirió a la casa comercial *Eastman Kodak Company* y presenta el siguiente genotipo: [pep4:: HIS3, prb- δ 1.6R HIS3, lys2-208, trp1- δ 101, ura 3-52, gal2, can1]

Vector de clonación

Se ha empleado el vector YEpFLAG-1 para expresar en *S. cerevisiae* la lipasa de interés (**Figura 4**).

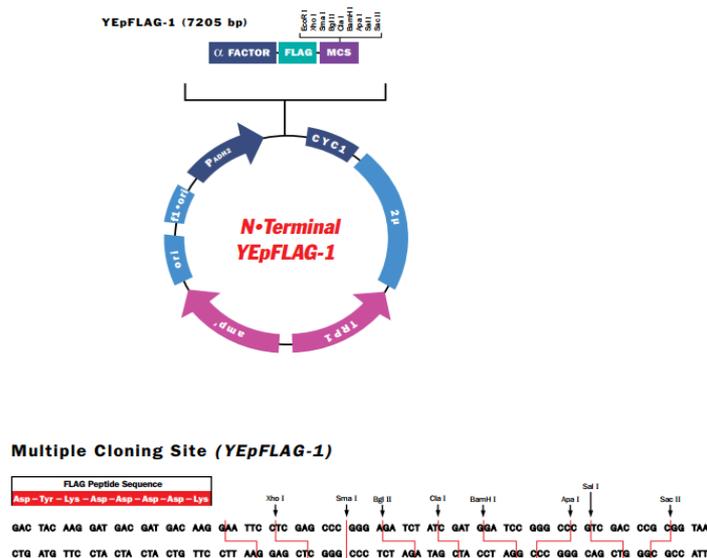


Figura 4: Vector de clonación empleado para expresar LIPD11. Tomado de Sigma Aldrich:

<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Vector/e9020vec.pdf>

Medida de la concentración proteica

Método Bradford

La concentración proteica del ultrafiltrado se determinó empleando el método de Bradford (Bradford, 1976), un método colorimétrico que nos permite detectar cantidades de proteínas de hasta 1 $\mu\text{g/mL}$. Este método se basa en el empleo del colorante Azul de Coomassie, que es de color rojo bajo condiciones ácidas, y que se une a los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas formando un complejo de color azul, cuya absorbancia puede ser medida a 595 nm y es una medida de la concentración proteica.

Para cuantificar las muestras se preparó 1 mL de cada muestra problema convenientemente diluida en agua bidestilada, de ahí se tomaron 800 μL y se llevaron a 1 mL con el reactivo *Protean-assay* de *Bio-Rad* en una dilución 1:5. Las muestras se agitaron vigorosamente con la ayuda de un vórtex y se incubaron 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se determinó la absorbancia, empleando un blanco preparado del mismo modo que las muestras, en el cual la muestra proteica se sustituyó por agua bidestilada. La recta de calibrado se elaboró con albúmina de suero bovino (BSA), en cantidades comprendidas entre 1 y 20 $\mu\text{g/mL}$.

Determinación de la actividad enzimática

Para medir la actividad enzimática se llevaron a cabo análisis espectrofotométricos, empleando sustratos cromogénicos. En concreto, se emplearon sustratos sintéticos derivados del p-nitrofenol. Para medir la actividad lipolítica los sustratos empleados fueron ácidos grasos de distinta longitud unidos mediante un enlace éster a una molécula de p-nitrofenol. Este análisis se basa en la propiedad óptica de la molécula de p-nitrofenol cuando se encuentra en solución. A pH ácido es incolora, pero a pH básico, el p-nitrofenol se convierte en p-nitrofenolato, un compuesto de color amarillo con un pico de absorción en torno a los 400 nm. Cuando la enzima hidroliza el sustrato libera moléculas de p-nitrofenol cuya concentración se puede medir espectrofotométricamente, aumentando el pH de la mezcla de reacción, y la variación de absorbancia a lo largo del tiempo puede relacionarse con la tasa de conversión de sustrato por las enzimas mediante la Ley de Lambert-Beer.

Actividad lipolítica

La reacción estándar para la estimación de actividad lipolítica consistió en un ensayo espectrofotométrico que empleó el p-nitrofenil laurato como sustrato, siguiendo el método previamente descrito (Fuciños *et al.*, 2005). Se empleó una disolución madre de p-nitrofenil

laurato 25 mM disuelto en etanol (preparado en fresco o guardado en congelador). En tubos Eppendorf se mezclaron 320 μL del tampón de reacción (tampón Tris/HCl 50 mM, pH 8.5 ajustado a 20-25°C, con CaCl_2 40 mM) con 40 μL de la solución madre de sustrato, y se incubaron 5 min a 60°C. Pasado este tiempo se añadieron 40 μL del extracto enzimático, se mezcló y se incubó durante 20 min a 60°C. La reacción se detuvo añadiendo 100 μL de Na_2CO_3 1 M frío para la desnaturalización de la enzima, y se mantuvieron los tubos en un baño de hielo durante 10 min. Los jabones formados precipitan por el ácido láurico liberado en la reacción saponificado con los iones Ca^{2+} procedentes del CaCl_2 . Finalmente, el precipitado se eliminó por centrifugación (13000 r.p.m., 10 min). En el sobrenadante se determinó la cantidad de p-nitrofenol, producido por la hidrólisis enzimática del p-nitrofenil laurato midiendo su absorbancia a 400 nm, frente a un blanco en el que no se añadió extracto enzimático. El coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol es $1.215 \pm 0.002 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, en las condiciones en las que se realiza este experimento. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que produce un μmol de p-nitrofenol por minuto en las condiciones estándares del ensayo. Las actividades se expresan en U/mL de medio de cultivo o en U/mg de proteína.

Caracterización bioquímica de LIPD11

Especificidad de sustrato

La especificidad de la enzima lipolítica frente a ésteres de ácidos grasos de distinta longitud de cadena se midió usando varios sustratos: p-nitrofenil hexanoato (pNP6), p-nitrofenil caprilato (pNP8), p-nitrofenil laurato (pNP12) y p-nitrofenil estearato (pNP18). Las condiciones de reacción fueron las mismas que las empleadas para la medida de actividad lipolítica estándar, pero en este caso la solución madre de sustrato se preparó a una concentración de 5mM en isopropanol para favorecer la disolución de los sustratos con ácidos grasos de mayor longitud, y por tanto más insolubles en agua.

Actividad lipolítica en función del pH

Se determinó el pH óptimo de reacción de la enzima llevando a cabo medidas de actividad lipolítica a diferentes valores de pH, entre 5 y 9. Las condiciones de reacción son las mismas que las del ensayo estándar, pero empleando los siguientes tampones en los rangos de pH indicados: tampón 50 mM Tris/maleico (pH 5-6) ajustado con NaCl; y tampón 50 mM Tris, CaCl_2 40 mM ajustado con HCl (pH 7-9).

Actividad lipolítica en función de la temperatura

Se determinó la temperatura óptima de reacción de la enzima llevando a cabo las medidas de actividad lipolítica a diferentes valores de temperatura, entre 40°C y 70°C. Las condiciones de reacción son las mismas que las del ensayo estándar de actividad.

Termoestabilidad

Se determinó la estabilidad de la enzima frente a la temperatura incubando la muestra enzimática a diferentes temperaturas: 70°C, 80°C, 85°C y 90°C. Se recogieron alícuotas a diferentes tiempos: 15, 30, 45 y 60 min (70°C); 5, 10, 15, 20 min (80°C); 2, 4, 6, 8 min (85°C) y 1, 2, 3, 4 min (90°C). Las condiciones de reacción son las mismas que las del ensayo estándar de actividad.

Efecto de detergentes, solventes orgánicos y otros agentes químicos

Se determinó el efecto de compuestos químicos diversos en LIPD11 usando las mismas condiciones de reacción que para determinar la actividad lipolítica variando únicamente el tampón de reacción (Tris/HCl 50 mM, pH 8.5 ajustado a 20-25°C, con CaCl₂ 40 mM) en el que se añade los diversos reactivos a las concentraciones de estudio.

Cinética enzimática

Para medir la variación de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato se empleó el sustrato pNP12 en un rango de concentraciones de 1.25 - 0.1 mM. Las condiciones de reacción fueron las mismas que para el ensayo de actividad estándar. Los valores de actividad para cada una de las concentraciones se ajustaron a una cinética de Michaelis-Menten y se estimaron los parámetros Km y Vmax.

Técnicas electroforéticas

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)

La separación de proteínas por electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE). El SDS se une a las proteínas en una proporción de una molécula cada dos aminoácidos, enmascarando la carga propia de la proteína y dotándola de una carga negativa uniforme. Por tanto, la migración de los complejos SDS-proteína tiene lugar únicamente en función de su tamaño. La electroforesis se realizó siguiendo básicamente el método de Laemmli (1970) y empleando el sistema *Mini PROTEAN 3 Cell* de *Bio-Rad*. Los geles se prepararon con una concentración de 5% de acrilamida en el gel

concentrador y 10% de acrilamida en el gel separador. Se empleó el marcador *NZY Colour Protein Marker II* como referencia de pesos moleculares. Las muestras se diluyeron en tampón de carga 4X (Tris/HCl 0.24 M pH 6.8, SDS al 10%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 15% y azul de bromofenol 0.04%). La mezcla se incubó 5 min a 95°C para desnaturalizar las proteínas. La cubeta se rellenó hasta cubrir el gel con tampón de electroforesis (Tris/HCl 0.02M, glicina 0.2M, SDS 0.003M pH 8.3) y se cargaron las muestras en los pocillos preparados en el gel concentrador. Las electroforesis se realizaron primero a 50 V y luego a 130 V. Se detuvieron al llegar el azul de bromofenol al extremo inferior del gel.

Métodos de tinción y detección de proteínas

Tinción con Azul de Coomassie de geles SDS-PAGE

Después de llevar a cabo la electroforesis de las proteínas, se sitúan los geles en cubetas de plástico donde se vierte la solución de tinción (ácido acético 7%, metanol 40%, Azul de Coomassie 0.25 mg/mL), previamente calentada, durante al menos 10 minutos se deja a 65°C en un agitador orbital. El exceso de colorante se elimina con solución de destinción (ácido acético 7%, metanol 40%), también calentada previamente y bajo agitación orbital.

Concentración de proteínas

Concentración con dispositivos Amicon© (Millipore)

Las proteínas del ultrafiltrado se concentraron para mejorar su visualización en los geles de SDS-PAGE en los dispositivos *Amicon© (Millipore)*, disponibles con membranas con distinto tamaño de corte. Para ello se centrifugaron en los dispositivos 2 mL del ultrafiltrado que contiene LIPD11 a 13000 r.p.m., 25 min siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Método de manipulación de proteínas

Desglicosilación con EndoH

Durante la expresión heteróloga de proteínas en levaduras, las proteínas de secreción pasan por el retículo endoplasmático, donde pueden sufrir una serie de modificaciones post-traduccionales entre las que se incluyen la N-glicosilación. Este fenómeno consiste en la unión de un oligosacárido de composición $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a los residuos de asparagina que se encuentran en la secuencia conservada Asn-X-Ser/Thr (donde X es cualquier

aminoácido excepto Pro). Este oligosacárido es modificado posteriormente, dando lugar a distintos tipos de carbohidratos con alto contenido en manosas y/o ramificados.

Esta modificación post-traducciona l podría afectar a la actividad de las enzimas. Además, la glicosilación suele ser un fenómeno heterogéneo, por lo que sería una fuente de heterogeneidad en las muestras de proteínas destinadas a obtención de cristales. La enzima Endoglicosidasa H elimina las N-glicosilaciones con oligosacáridos de alto contenido en manosa y algunos tipos de oligosacáridos híbridos, pero no completamente, ya que deja una N-acetilglucosamina unida al residuo de asparagina.

Para llevar a cabo la reacción de desglicosilación en condiciones desnaturizantes se empleó la enzima Endoglicosidasa H o Endo H (*New England Biolabs*) siguiendo las instrucciones del manual. Se mezclaron 1-20 µg de proteína con 1 µL de *Glycoprotein Denaturing Buffer* 10X suministrado con la enzima y agua bidestilada hasta completar 10 µL, y se desnaturizó a 100°C durante 10 minutos. Entonces se añadieron 2 µL de *Reaction Buffer* G5 10X, 1-5 µL EndoH y agua bidestilada hasta completar 20 µL. Se incubó la mezcla de reacción a 37°C durante 1-2 h.

Herramientas bioinformáticas

El análisis *in silico* de la proteína heteróloga LIPD11 se llevó a cabo empleando distintas herramientas bioinformáticas disponibles en la página web “ExpASy Proteomics Server” (<http://www.expasy.ch/>). También se usó la aplicación ProtParam, que permite deducir varios parámetros fisicoquímicos de una proteína a partir de la secuencia, tales como la composición aminoacídica, peso molecular, punto isoeléctrico y coeficiente GRAVY, entre otros. Para la predicción de la estructura terciaria se realizó a partir del programa Swiss Model (<https://swissmodel.expasy.org/>), que ajusta la secuencia aminoacídica a un patrón 3D usando secuencias y patrones 3D conocidos. Por último, se usó el programa RasWin para obtener la localización del codo catalítico en la estructura predicha y marcarlo con color rojo y con un patrón de bolas y bastones.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Medida de la concentración proteica

Este método se empleó para determinar la cantidad proteica de la que se parte en el ultrafiltrado donde se encuentra la LIPD11. Los resultados del análisis determinaron que se parte de una solución que contiene 5.42 μg de proteína total/mL.

Especificidad de sustrato

Para la caracterización bioquímica de la enzima lipolítica empleada, uno de los primeros análisis a realizar fue la especificidad de sustrato: a ácidos grasos de cadena corta o larga, para determinar si se trata de una esterasa o una lipasa respectivamente. Para ello, se emplearon sustratos con una longitud de cadena de 6, 8, 12 y 18 carbonos. El análisis de la actividad enzimática con dichos sustratos nos muestra que estamos caracterizando una esterasa, ya que presenta mayor predilección por el sustrato con longitud de cadena de 8 carbonos (**Figura 5**). Esto nos hace pensar que también se ajustará bien a una cinética clásica de Michaelis-Menten ya que no posee la tapa hidrofóbica que poseen las lipasas (**Figura 6**).

Se ha observado también que el sustrato de reacción, pNP hexanoato (6 carbonos) se autohidroliza fácilmente sin que se tenga que llevar a cabo la reacción enzimática. Por lo tanto, la veracidad de los resultados con este sustrato no se puede asegurar.

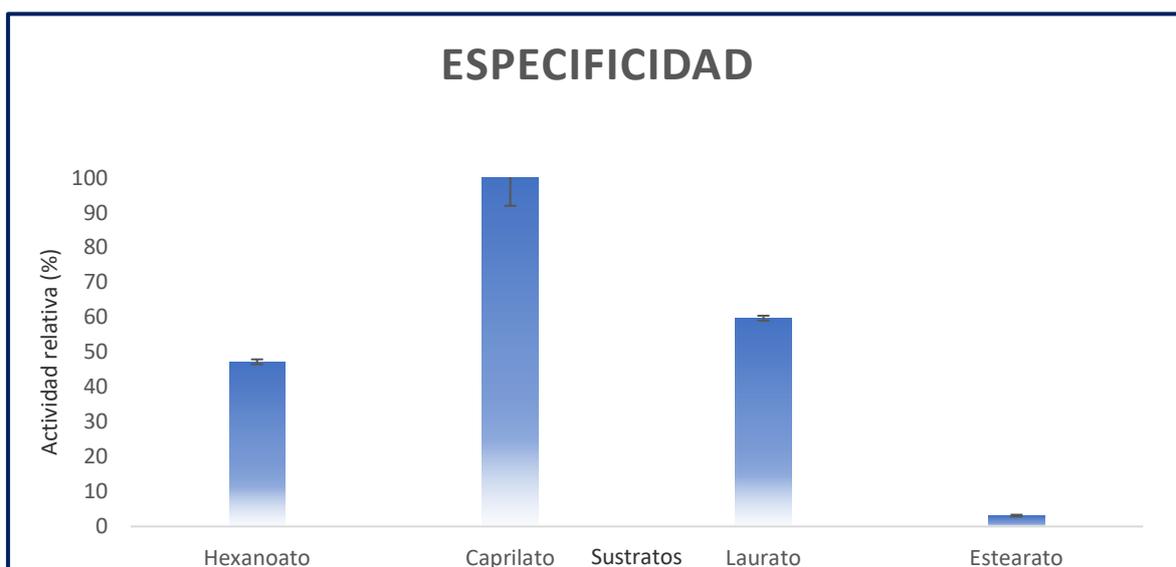


Figura 5: Especificidad de sustrato de LIPD11. Los datos representados muestran la media \pm desviación estándar, n=3.

Cinética enzimática

La cinética de la esterasa, la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato, muestra que se ajusta bien a una cinética clásica tal y como habíamos predicho en el punto anterior, con un ajuste $r^2 = 0.80$. De la recta que se obtiene de la cinética, representada en la **Figura 6**, se puede extraer la ecuación de la recta y conocer los parámetros de $V_{max} = 31.21$ U/mL y $K_m = 0.17$ mM.

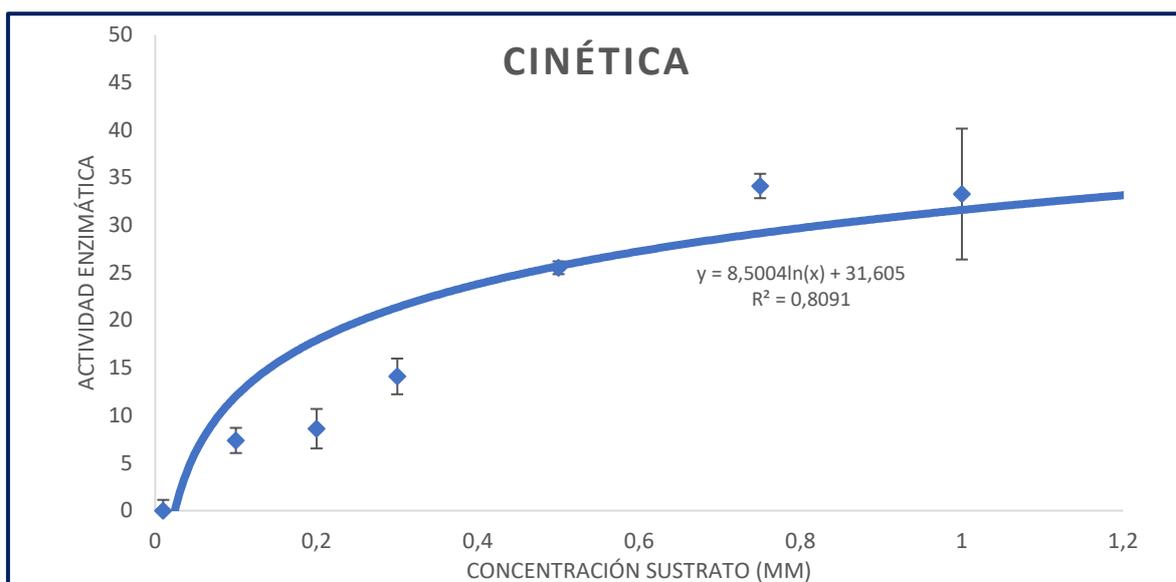


Figura 6: Cinética de Michaelis-Menten para la esterasa en estudio empleando pNP12 como sustrato. Los datos representados muestran la media \pm desviación estándar, $n=3$.

Efecto de la temperatura y el pH en la actividad

El efecto de la temperatura en la esterasa empleada en este trabajo ha mostrado una mayor actividad enzimática a los 60°C. A temperaturas por debajo de los 60°C su actividad aumenta a medida que aumenta la temperatura, sin embargo, a partir de dicha temperatura su eficacia en la hidrólisis del pNP-laurato disminuye drásticamente, presentando una actividad reducida a los 70/75°C (**Figura 7**).

En comparación con publicaciones realizadas que estudian termozimas aisladas de ambientes extremos, se ve que dichas lipasas presentan de manera análoga a nuestra enzima mayor actividad entorno a los 50-70°C (Chihaya *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2016).

Debido a que esta enzima se aisló de una biblioteca metagenómica de aguas termales resulta lógico que tenga su temperatura óptima en torno a los 60°C.

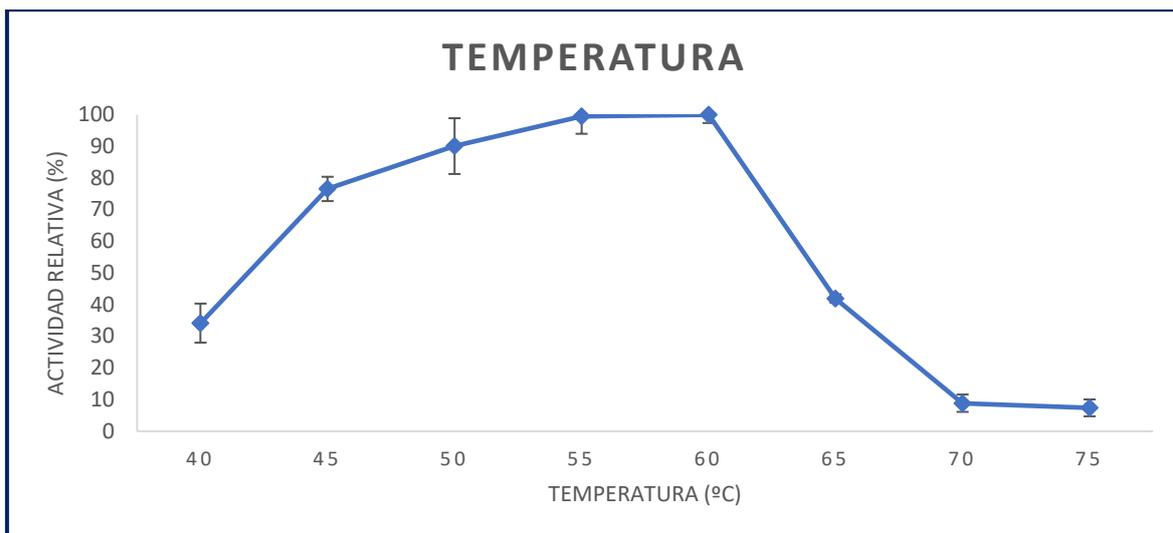


Figura 7: Actividad lipolítica de la esterasa en función de la temperatura. Los datos representados muestran la media \pm desviación estándar, $n=3$.

En cuanto al pH se observa una clara predilección a disoluciones con pH alcalinas, presentando mayor actividad a los 8.5 de pH. Debido a que la enzima se extrajo de aguas termales a pH de 8.2, tal como se indica en la introducción, es lógico que presente mayor actividad en este rango de pH (**Figura 8**).

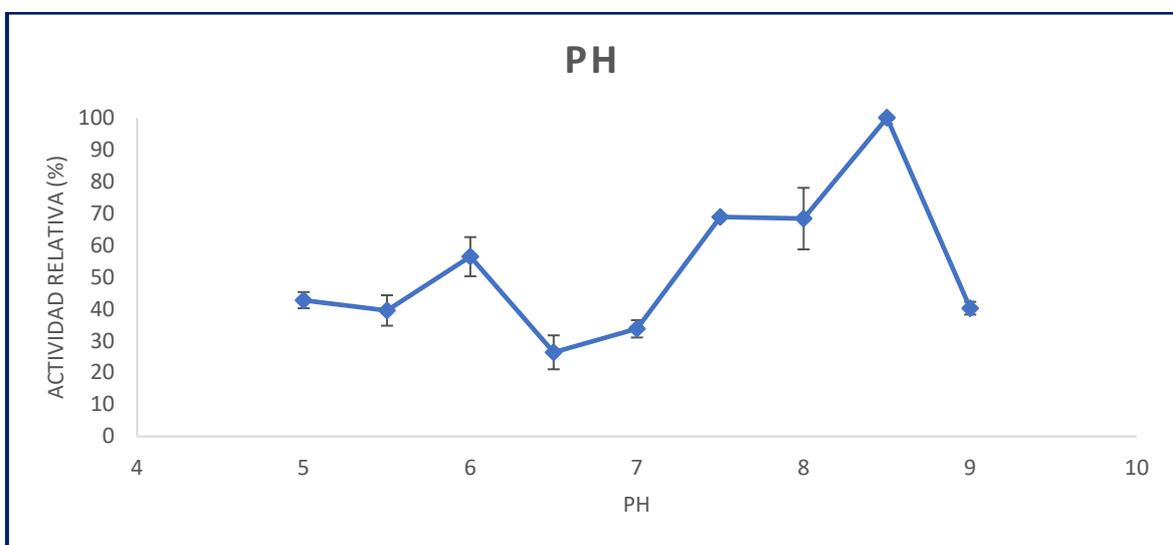


Figura 8: Actividad lipolítica de la esterasa a varios valores de pH. Los datos representados muestran la media \pm desviación estándar, $n=3$.

En las referencias bibliográficas, podemos observar que las enzimas lipolíticas obtenidas de ambientes termófilos suelen presentar un pH óptimo de 8 – 9 mayoritariamente, es decir, son más activas a pH alcalinos o básicos (Shao *et al.*, 2013; Chihaya *et al.*, 2016) como sucede con la LIPD11.

Estabilidad térmica

La termoestabilidad de la esterasa se determinó incubando la enzima a diversas temperaturas y realizando la medida de actividad lipolítica a intervalos de tiempo predefinidos. Tal y como se muestra en la **Figura 9**, la enzima resiste poco a la influencia de la incubación de la misma a 90°C, perdiendo la actividad drásticamente después de 1-2 minutos. Al incubarla a los 85°C se ve que resiste un poco más, hasta los 6 minutos, tras los cuales pierde la actividad de nuevo. A los 80°C aguanta hasta los 10 minutos tras los cuales disminuye su actividad, y a los 70°C se ve como se mantiene el 50% de la actividad a pesar de la incubación tras 1 hora. Esto nos indica la termoestabilidad que presenta LIPD11 (**Figura 9**).

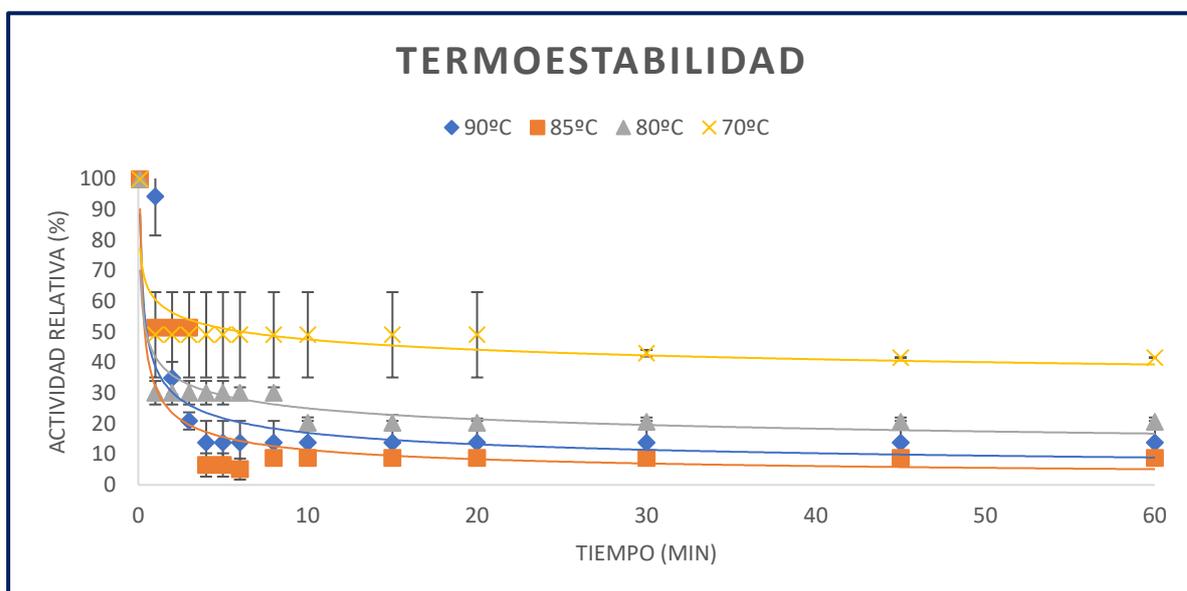


Figura 9: Actividad lipolítica de la esterasa tras varios tiempos de incubación a diversas temperaturas. Los datos representados muestran la media \pm desviación estándar, $n=3$.

Efecto de detergentes, solventes orgánicos y otros agentes químicos

La actividad esterasa se ve frecuentemente afectada por muchos factores, como solventes orgánicos, surfactantes e iones metálicos. Para estudiar la estabilidad de LIPD11 en solventes orgánicos, se examinaron las actividades enzimáticas después de ser tratadas en los solventes orgánicos seleccionados: etanol, metanol, isopropanol y 2 - mercaptoetanol. Se observó (**Tabla 1**) que, con todos los solventes ensayados, independientemente de su concentración, su actividad enzimática disminuye respecto al control. Se observó también

una elevada autohidrólisis del sustrato usando el 2-mercaptoetanol a una concentración de 10 mM. La actividad de nuestra lipasa en presencia de surfactantes: Tween 20, Tween 80, Triton X100 y SDS muestra que la actividad de la enzima aumenta mucho en la mayor parte de los casos, lo cual tiene sentido ya que se trata de detergentes que actúan simultáneamente en el sustrato pNP-laurato generando un efecto acumulativo y por tanto mayor degradación del ácido graso. Se observa que el EDTA tiene un efecto activador de la enzima, al contrario, de lo que ocurre con el DTT. Y los cationes: Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} parecen tener un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima. Por tanto, el agente quelante EDTA no mostró ningún efecto inhibitorio sobre LIPD11, lo que parece indicar que no es una metaloenzima y los iones metálicos no son necesarios para la actividad catalítica de LIPD11 (Shao *et al.*, 2013).

Tabla 1: Actividad lipolítica de la esterasa en presencia de compuestos químicos diversos. Los datos muestran la media \pm desviación estándar de $n=3$.

Control	Actividad enzimática relativa (%)		
	107.8 \pm 1.9 = 100%		
Aditivos	0,1 (mM)	1 (mM)	10 (mM)
Mg^{+2}	77.1 \pm 0.2	44.7 \pm 0.07	29.6 \pm 0.02
Mn^{+2}	41.6 \pm 0.03	45.9 \pm 0.03	53.9 \pm 0.1
Zn^{+2}	118.2 \pm 0.1	51.3 \pm 0.00	14.1 \pm 0.02
Ni^{+2}	99.1 \pm 0.09	78.5 \pm 0.04	57.9 \pm 0.06
DTT	29.5 \pm 0.01	65.7 \pm 0.04	7.6 \pm 0.1
EDTA	125.9 \pm 0.1	112.1 \pm 0.1	147.7 \pm 0.07
Solventes orgánicos			
Etanol	64.3 \pm 0.05	81.4 \pm 0.08	50 \pm 0.006
Metanol	82.6 \pm 0.03	56.2 \pm 0.03	33.3 \pm 0.04
Isopropanol	24.9 \pm 0.0005	89.5 \pm 0.08	32.1 \pm 0.01
2-Mercaptoetanol	64.2 \pm 0.3	63.8 \pm 0.1	-94.7 \pm 0.1
Surfactantes			
Tween 80	320.1 \pm 0.2	263.4 \pm 0.3	113.1 \pm 0.04
Tween 20	276.3 \pm 0.09	429.8 \pm 0.4	-59.3 \pm 0.01
Triton x100	398.3 \pm 0.05	414.3 \pm 0.5	742.9 \pm 0.4
SDS	13.5 \pm 0.05	17.4 \pm 0.01	110.5 \pm 0.1

Detección de proteínas

El SDS-PAGE realizado tras la tinción con azul de Coomasie estimó un peso molecular de LIPD11 en aproximadamente 32 kDa. Esto coincide con la predicción de peso molecular realizado con el servidor ExPASy (**Figura 10**).

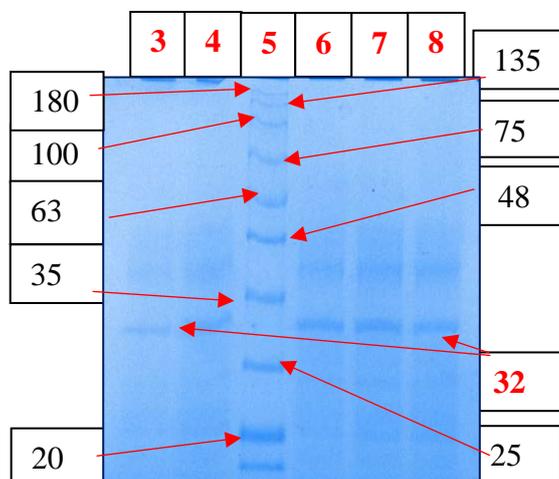


Figura 10: Gel SDS-PAGE en el que se ve en el 5º carril el marcador de pesos moleculares. En los carriles 3º y 4º con una concentración de 3:1 de esterasa purificada y los carriles 6º, 7º y 8º con una concentración 6:2.

Tratamiento con EndoH

Los resultados del gel SDS-PAGE nos muestran que la banda que pertenece a nuestra proteína tiene el mismo tamaño respecto a la tratada con EndoH por lo que podemos deducir que no está glicosilada, esto la hace ideal para su cristalización. (**Figura 11**).

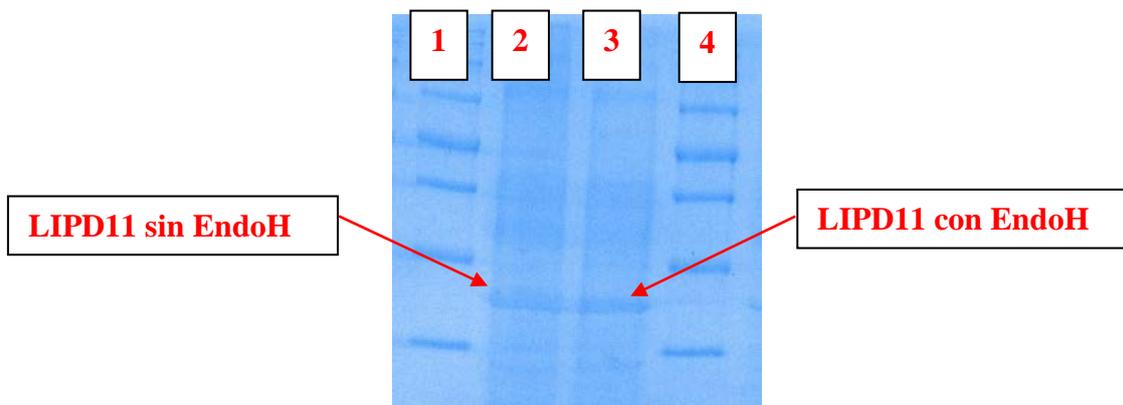


Figura 11: Gel SDS-PAGE. Carriles 1 y 4 marcador de pesos moleculares. Carril 2 LIPD11 en condiciones nativas y carril 3 LIPD11 tratada con EndoH.

Herramientas bioinformáticas

Se usaron varias páginas web de acceso libre <https://web.expasy.org/translate/> para predecir el punto isoelectrico y el peso molecular de la enzima, dando como resultado un punto isoelectrico de 5.21 y un peso molecular de 32153.05 Daltons.

Por último, se predijo un modelo de la estructura terciaria a partir de la secuencia primaria de la proteína usando el siguiente programa, <https://swissmodel.expasy.org/>, gracias a él obtenemos una predicción de la estructura tridimensional de la enzima (**Figura 12**). Se usó también el programa RasWin para determinar la localización del codo catalítico dentro de la estructura tridimensional. Se observa la presencia de la Ser catalítica en el centro del pentapéptido conservado Gly-X-Ser-X-Gly característico de las enzimas lipolíticas.



Figura 12: Modelo 3D de la LIPD11 predicho por SwissModel en dónde se señala en rojo y en forma de bastones y bolas la glicina, la serina y la glicina del codo catalítico.

5. CONCLUSIONES

- La temperatura y pH óptimo de la LIPD11 son los esperados para una enzima termófila extraída de aguas termales, siendo a 60°C y a pH de 8.5 su máximo de actividad enzimática
- La actividad de la enzima se ve favorecida por la presencia de los surfactantes: Tween 80, Tween 20, Tritón X100 y 10 mM de SDS, mientras que disminuye en presencia de: etanol, metanol, isopropanol, 2-mercaptoetanol, DTT y los cationes divalentes: Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} y Ni^{+2} . El EDTA parece favorecer la actividad de la enzima por lo que se trata de una enzima que parece no necesitar iones metálicos para su función enzimática.
- El estudio de la especificidad de sustrato nos ha mostrado que se trata de una esterasa que presenta mayor actividad con pNP caprilato, presentado una cinética que encaja con la clásica de Michaelis-Menten obteniéndose una K_m de 0.17 mM y una V_{max} de 31.21 U/mL.
- La enzima LIPD11 mantiene el 50% de su actividad inicial tras una hora de incubación a 70°C.
- El peso molecular de LIPD11 determinado mediante electroforesis en gel SDS-PAGE fue de 32 KDa.
- El tratamiento con EndoH nos muestra que no está glicosilada por lo que es una enzima idónea para cristalizar.
- La predicción de la estructura tridimensional de la LIPD11 nos muestra la presencia del codo catalítico en una posición central manteniendo el pentapéptido Gly-X-Ser-X-Gly característico de las enzimas lipolíticas.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adlercreutz, P. (2013). Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chem Soc Rev.* 42(15):6406-6436.
- Bhosale, H., Shaheen, U., Kadam, T. (2016). Characterization of a Hyperthermostable Alkaline Lipase from *Bacillus sonorensis* 4R. *Enzyme Res.* 4170684.
- Bornscheuer, U. T., Khalameyzer, V., Fischer, I., Altenbuchner, J. (1999). Screening, nucleotide sequence, and biochemical characterization of an esterase from *Pseudomonas fluorescens* with high activity towards lactones. *Appl Environ Microb.* 65(2):477–482.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Chihaya, Y., Kota, S., Noriyasu, I., Masaki, M., Takatoshi, A., Shigeo, N., Shinya, F.(2017). Isolation and characterization of a thermostable lipase from *Bacillus thermoamylovorans* NB501. *J Gen Appl Microbiol.* 62(6):313–319.
- Deive, F. J., Domínguez, A., Sanroman, M. A., Longo, M. A. (2003). Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *J Chem Tech Bio.* 78(11):1166–1170.
- Fojan, P., Neves-Petersen, M. T., Gryczynski, Z., Lakowicz, J., Pedersen, S., Petersen, E., Petersen, B. S. (2002). High probability of disrupting a disulphide bridge mediated by an endogenous excited tryptophan residue. *Protein Sci.* 11(3):588–600.
- Fuciños, P., Domínguez, A., Angeles Sanromán, M., Longo, M. A., Luisa Rúa, M., Pastrana, L. (2005). Production of thermostable lipolytic activity by *Thermus* species. *Biotechnol Progress.* 21(4):1198–1205.
- Gao, W., Wu, K., Chen, L., Fan, H., Zhao, Z., Gao, B., Wang, H., Wei, D. (2016). A novel esterase from a marine mud metagenomic library for biocatalytic synthesis of short-chain flavor esters. *Microb Cell Fact.* 15:41.
- Godoy, C, A. (2017). New Strategy for the Immobilization of Lipases on Glyoxyl–Agarose Supports: Production of Robust Biocatalysts for Natural Oil Transformation. *Int J Mol Sci.* 18(10).

González-Bacerio, J., Moreno-Medina, V. R., Martínez, A. M. (2010). Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Rev Colomb Biotechnol.* 12(1):124-140.

Gupta, R., Mehta, P., Saun, N, K. (2014). Purification and physicochemical properties of lipase from thermophilic *Bacillus aerius*. *J Oleo Sci.* 63.(12):1261-1268.

Haki, G, D., Rakshit, S, K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol.* 89(1):17-34.

Jaeger, K, E., Wilhelm, S., Tommassen, J. (1999). A Novel Lipolytic Enzyme Located in the Outer Membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 181(22):6977-6986.

Jaeger, K, E., Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* 13(4):390-397.

Kambourova, M., Kirilova, N., Mandeva, R., Derekova, A. (2003). Purification and properties of thermoestable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC7. *J Mol Catal B Enzym.* 22(5-6): 307-313.

Kanmani, P., Kumaresan, K., Aravind, J. (2015). Gene cloning, expression, and characterization of the *Bacillus amyloliquefaciens* PS35 lipase. *Braz J Microbiol.* 46(4):1235-1243.

Kaur, G., Singh, A., Sharma, R., Sharma, V., Verma, S., Sharma, P, K. (2016). Cloning, expression, purification and characterization of lipase from *Bacillus licheniformis*, isolated from hot spring of Himachal Pradesh, India. *3 Biotech.* 6(1):49.

Khan, F, I., Lan, D., Durrani, R., Huan, W., Zhao, Z., Wang, Y. (2017). The Lid Domain in Lipases: Structural and Functional Determinant of Enzymatic Properties. *Front Bioeng Biotechnol.* 5:16.

Koc, M., Cokmus, C., Cihan, C, A. (2015). The genotypic diversity and lipase production of some thermophilic bacilli from different genera. *Braz J Microbiol.* 46(4):1065-1076.

Laemmli, U, K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* (227):680-685.

- Lee, D, W., Koh, Y, S., Kim, K, J., Kim, B, C., Choi, H, J., Kim, D, S., Suhartono, M, T., Pyun, Y, R. (1999). Isolation and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. FEMS Microbiol Lett. 179(2):393-400.
- Leis, B., Angelov, A., Mientus, M., Li, H., Pham, V,T,T., Lauinger, B., Bongen, P., Pietruszka, J., Gonçalves, L,G., Santos, H., Liebl, W. (2015). Identification of novel esterase-active enzymes from hot environments by use of the host bacterium *Thermus thermophilus*. Front Microbiol. 6:275.
- Li, H., Zhang, X. (2005). Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp.TW1. Protein Expr Purif 42(1):153-159.
- Liu, W., Li, M., Yan, Y. (2017). Heterologous expression and characterization of a new lipase from *Pseudomonas fluorescens* Pf0–1 and used for biodiesel production. Sci Rep. 7:15711.
- 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. Front Microbiol. 6:1291.
- Nagarajan, S. (2012). New Tools for Exploring “Old Friends—Microbial Lipases”. Appl Biochem Biotechnol. 168(5):1163-1196.
- Olusesan, A, T., Azura, L, K., Abubakar, F., Sheikh Abdul Hamid, N., Radu, S., Saari, N. (2009). Phenotypic and molecular identification of a novel thermophilic *Anoxybacillus* species: a lipase-producing bacterium isolated from a Malaysian hot spring. World J Microbiol Biotechnol. 25(11):1981-1988.
- Piscitelli, A., Tarallo, V., Guarino, L., Sannia, G., Birolo, L., Pezzella, C. (2017). New lipases by mining of *Pleurotostreatus* genome. Plos One. 12. 9:e0185377.
- Rabbani, M., Bagherinejad, M, R., Sadeghi, H, M., Shariat, Z, S., Etemadifar, Z., Moazen, F., Rahbari, M., Mafakher, L., Zaghian, S. (2013). Isolation and characterization of novel thermophilic lipase-secreting bacteria. Braz J Microbiol. 44(4):1113-1119.
- Rahman, R, N, Z, R, A., Leow, T,C., Salleh, A, B., Basri, M. (2007). *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia. BMC Microbiol. 7:77.

- Sayer, C., Szabo, Z., Isupov, M, N., Ingham, C., Littlechild, J, A. (2015). The Structure of a Novel Thermophilic Esterase from the Planctomycetes Species, *Thermogutta terrifontis* Reveals an Open Active Site Due to a Minimal 'Cap' Domain. *Front Microbiol.* 6:1294.
- Schmidt-Dannert, C., Rúa, M, L., Atomi, H., Schmid, R, D. (1996). Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochim Biophys Acta.* 1301(1-2):105-114.
- Shahinyan, G., Margaryan, A., Panosyan, H., Trchounian, A. (2017). Identification and sequence analyses of novel lipase encoding novel thermophilic bacilli isolated from Armenian geothermal springs. *BMC Microbiol.* 17:103.
- Shao, H., Xu, L., Yan, J. (2013). Isolation and characterization of a thermostable esterase from a metagenomic library. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 40(11):1211-1222.
- Sharma, P, K., Singh, K., Singh, R., Capalash, N., Ali, A., Mohammad, O., Kaur, J., (2012). Characterization of a thermostable lipase showing loss of secondary structure at ambient temperature. *Mol Biol Rep.* 39(3):2795-804.
- Sharma, S., Kanwar, S, S. (2014). Organic solvent tolerant lipases and applications. *Scientific World J.* 9: 2748–2757.
- Soleymani, S., Alizadeh, H., Mohammadian, H., Rabbani, E., Moazen, F., Sadeghi, H, M., Shariat, Z, S., Etemadifar, Z., Rabbani, M. (2017). Efficient Media for High Lipase Production: One Variable at a Time Approach. *J Med Biotech.* 9(2):82-86.
- Sun, Q., Wang, H., Zhang, H., Luo, H., Shi, P., Bai, Y., Lu, F., Yao, B., Huang, H. (2016). Heterologous production of an acidic thermostable lipase with broad-range pH activity from thermophilic fungus *Neosartorya fischeri* P1. *J Biosci Bioeng.* 122(5):539-544.
- Tiwari, V. (2016). *In vitro* Engineering of Novel Bioactivity in the Natural Enzymes. *Front Chem.* 4:39.
- Yang, W., Xu, L., Zhang, H., Yan, Y. (2015). Characterizing LipR from *Pseudomonas* sp. R0-14 and applying in enrichment of polyunsaturated fatty acids from algal oil. *J Microbiol Biotechnol.* 25(11):1880-1893.