



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**MÁSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR Y
GENÉTICA**

**Identificación de nuevas termoenzimas de interés industrial mediante
metagenómica**

**Identificación de novas termoencimas de interese industrial mediante
metaxenómica**

**Identification of new thermozyms of industrial interest by means of
metagenomics**

Autor: Ariel A. Hernández Camacho

Directora: María Isabel González Siso

TRABAJO FIN DE MASTER

D/Dna. María Isabel González Siso autorizo la presentación del Trabajo de Fin de Máster: **Identificación de nuevas termoenzimas de interés industrial mediante metagenómica** presentado por el alumno **Ariel Antonio Hernández Camacho**, estudiante del Máster en Biología Molecular, Celular y Genética, para su defensa ante el tribunal cualificador.

En A Coruña, el 18 de Julio del 2018

Fdo.: M^a Isabel González Siso

Agradezco de manera inmensurable, por su dedicación y paciencia, al equipo de investigadores del laboratorio de Bioquímica, especialmente a la profesora M^a Isabel y a Juanjo, que me ayudaron a comprender muchas cosas de esta fascinante ciencia. Es una meta más que me propongo y logro cumplir, y no habría sido posible sin el apoyo de mi familia, que siempre está ahí en las buenas y en las malas, aportándome lo mejor que pueden; también a mis amigos y compañeros, junto a ellos descubro más del mundo y de las cosas bellas de la vida.

	Páginas
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
1-INTRODUCCIÓN	3
1.1-El desarrollo de la metagenómica	3
1.2-Obtención de un metagenoma y creación de metagenotecas	4
1.3-Técnicas de cribado en metagenotecas	6
1.4-Metagenómica de microorganismos termófilos	8
1.5-Metagenómica y la industria	9
1.6-Enzimas de interés industrial	10
2-OBJETIVO GENERAL	13
2.1-Objetivo específico	13
3-MÉTODOS	13
3.1-Condiciones de cultivo bacteriano	13
3.1.2-Cepa de E. coli	13
3.1.3-Medio de cultivo Luria Bertani	13
3.2-Cribado funcional en metagenotecas	14
3.2.1-Cribado funcional de feruloil esterasas	14
3.2.2-Cribado funcional de β -xilosidasas	15
3.2.3-Ensayo de purificación y secuenciación del ADN	15
3.2.4-Identidad del ADN	17
3.2.5-Separación de la fracción intracelular y la fracción extracelular	17
3.2.6-Ensayo de actividad enzimática a punto final	17
3.2.7-Identificación de actividad β -xilosidasa en las fracciones celulares con sustrato MUX	18
3.2.8-Ensayos de digestión con enzimas de restricción específica	19
3.3-Elaboración de electroforesis en gel de agarosa al 0.7%	20
3.3.1-Ensayo de ligación en los vectores pSmart y pJet 1.2	20
3.3.2-Ensayo de transformación de E. coli competentes con los vectores pJet 1.2 y pSmart	21
3.3.3-Cribado funcional de subclones con actividad β -xilosidasa	22
3.3.4-Ensayo de PCR de colonias	22
3.3.5-Ensayo de purificación y secuenciación del ADN	23
3.3.6-Identificación de actividad β -xilosidasa en las fracciones celulares mediante cromatografía líquida de alta resolución	24
3.3.7-ensayo de actividad enzimática bacteriana en sustrato PNPX	25

4-RESULTADOS	26
4.1-Cribado funcional de enzimas feruloil esterasas	26
4.2-Cribado funcional de enzimas β -xilosidasa	26
4.2.1-Identificación de la fracción celular que contiene la enzima β -xilosidasa con sustrato colorimétrico PNPX	27
4.2.2-Identificación de la fracción celular que contiene la enzima β -xilosidasa con sustrato fluorescente MUX	28
4.2.3-Identificación de la fracción celular que contiene la enzima β -xilosidasa mediante el uso de la cromatografía líquida de alta eficacia	28
4.3-Purificación y secuenciación del ADN de los clones con actividad β -xilosidasa en placa con sustrato MUX	29
4.3.1-Aislamiento del gen con actividad β -xilosidasa o glucosidasa	32
4.3.2-Purificación y secuenciación de los subclones	34
4.3.3-Identificación del subclón con actividad β -xilosidasa en placa con sustrato MUX	35
4.3.4-Comparación de la hidrólisis del PNPX entre clones positivos en sustrato MUX y β -xilosidasa comercial	35
5-DISCUSIÓN	36
6-CONCLUSIONES	38
7-BIBLIOGRAFÍA	39

Lista de símbolos y abreviaturas

Abs	Absorbancia
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal
Blastn	Basic Local Alignmet Search Tool for nucleotide
BSA	Albúmina Sérica Bovina
°C	Grados Centígrados
cm	Centímetro
dNTPs	Desoxirribonucleótidos Trifosfatos
ds	Doble Cadena
EC	Clasificación de Enzimas
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
FE	Fracción Extracelular
FI	Fracción Intracelular
g	Gramo
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
Kb	Kilobases
LB	Medio de Cultivo Luria Bertani
LBA	Medio de Cultivo Luria Bertani con ampicilina
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M	Molar
mg	Miligramo
MUCMAC	4-Metilumbeliferil ρ -Trimetilamonio Cinamato Clórico
MUX	4-metilumbeliferil- β -D- xilopiranósido
nm	Nanómetro
NCBI	National Center of Biotechnology Information
OD	Densidad Óptica
PCR	Reacción en Cadena de Polimerasas
PNPX	4-Nitrofenil- β -D-Xilopiranósido
r.p.m	Revoluciones por Minuto
SAI	Servicios de Apoyo a la Investigación
TAE	Tampón Tris Acetato EDTA
TE	Tampón Tris-EDTA
U	Unidad Enzimática
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
μL	Micro litro
μg	Microgramo
V	Voltios

Resumen

La metagenómica es una rama de las ciencias biológicas que estudia el genoma completo o parcial de todos los microorganismos que componen un hábitat. Ha permitido identificar nuevos microorganismos y sus funciones, al mismo tiempo nos ha abierto las puertas a una serie de genes que antes no eran accesibles. La industria, en sus diferentes áreas, ha visto una oportunidad rentable y ecológicamente sostenible utilizando los productos bacterianos como las enzimas de microorganismos que, sin el uso de técnicas metagenómicas, no habría sido posible su obtención, como los termófilos. En el presente estudio se investigó sobre nuevas termoenzimas de fuentes geotermales de Galicia mediante metagenómica. Fundamentalmente con técnicas de cribado funcional de metagenotecas se investigó la existencia de feruloil esterases y β -xilosidasas del metagenoma de Rio Caldo, As Burgas y Muiño Da Veiga, tres fuentes geotermales de Galicia. Se logró aislar varios clones con actividad β -xilosidasa, cuyas propiedades aún deben ser investigadas más a fondo.

Resumo

A metaxenómica é unha rama das ciencias biolóxicas que estuda o xenoma completo ou parcial de todos os microorganismos que compoñen un hábitat. Permitted identificar novos microorganismos e as súas funcións, ao mesmo tempo abriunos as portas a unha serie de xenes que antes non eran accesibles. A industria, nas súas diferentes áreas, viu unha oportunidade rendible e ecoloxicamente sustentable utilizando os produtos bacterianos como as encimas de microorganismos que, sen o uso de técnicas metaxenómicas, non sería posible a súa obtención, como os termófilos. No presente estudo investigouse sobre novas termoencimas de fontes xeotermals de Galicia mediante metaxenómica. Fundamentalmente con técnicas de cribado funcional de metaxenotecas investigouse a existencia de feruloil esterases e β -xilosidasas do metaxenoma de Rio Caldo, As Burgas e Muiño Da Veiga, tres fontes xeotermals de Galicia. Logrouse illar varios clons con actividade β -xilosidasa, cuxas propiedades aínda deben ser investigadas máis a fondo.

Abstract

Metagenomics is a branch of the biological sciences that studies the complete or partial genome of all the microorganisms that compose a habitat. It has allowed to identify new microorganisms and their functions, at the same time has opened us the doors to a series of genes that before were not accessible. The industry, in its different areas, has seen a profitable opportunity, and ecologically sustainable, using the bacterial products like the enzymes of microorganisms that, without the use of metagenomics techniques, would not have been possible to obtain, like thermophiles. In the present study we investigated on new thermozyms from hot springs of Galicia by means of metagenomics. Fundamentally with techniques of functional screening of metagenomic libraries, we investigated the existence of feruloyl esterases and β -xylosidases of the metagenomes of Río Caldo, As Burgas and Muíño da Veiga, three hot springs of Galicia. Several clones with β -xylosidase activity were isolated, whose properties still have to be investigated more thorough.

1-Introducción

1.1-El desarrollo de la metagenómica

En la microbiología del siglo 19 y hasta finales del siglo 20, el cultivo puro se consideraba como la mejor manera de estudiar los microorganismos. Se tenía la errada creencia de que todos los microorganismos existentes en el medio ambiente podían y habían sido cultivados en el laboratorio (Handelsman, 2004). La presunción zozobró cuando se comprobó la desigualdad entre la cantidad de microorganismos observados directamente en la muestra ambiental y la cantidad de colonias que eran observadas en medios de cultivo (Staley y Konopka, 1985). Lo cierto es que menos del 1% de los microorganismos presentes en el ambiente pueden ser cultivados en el laboratorio (Uchiyama y Miyazaki, 2009). Debido a esto, se constató la necesidad de crear nuevas técnicas que permitieran el estudio de estos microorganismos, facilitando su identificación, conocer su fisiología y su función en el ecosistema.

Carl Woese, cuando descubrió que la secuenciación de la subunidad 16S del ARN ribosomal permitía conocer el pasado de los microorganismos (Woese, 1987), proporcionó la herramienta adecuada para que otros científicos pudieran analizar quien habita el basto mundo

de los microorganismos ambientales (Pace et al, 1987). El advenimiento de técnicas moleculares más avanzadas como la PCR y la secuenciación de nueva generación, aumentó las posibilidades de identificación de la diversidad microbiológica (Eden et al, 1991). Con estas herramientas se desarrolla la metagenómica, una rama de las ciencias genómicas que estudia el genoma completo o parcial de todos los microorganismos que componen un ecosistema. Esto se realiza gracias al aislamiento del ADN presente en dicho ambiente (Handelsman, 2004).

La metagenómica ha permitido escudriñar la diversidad microbiológica, sus funciones e interacciones en el ecosistema, comparar las diferencias y similitudes entre ecosistemas en el mundo, y encontrar nuevas biomoléculas con muchas aplicaciones de interés para la humanidad (Simon y Daniel, 2011).

1.2-Obtención de un metagenoma y creación de metagenotecas

Pace en 1985, propuso que era posible extraer el ADN de los microorganismos del ambiente y clonarlo para su estudio posterior. Para la obtención del metagenoma de un hábitat ecológico primero debemos aislar y purificar el ADN contenido en una muestra del mismo. Existen dos métodos para extraer y purificar este ADN: el método directo, basado en la lisis de los microorganismos y el aislamiento del ADN. Y el método indirecto, basado en la separación de los microorganismos del resto de sustrato (v.g. suelo, agua, residuos orgánicos) y posterior lisis para la obtención del ADN (Schmeisser *et al*, 2007). La separación del sustrato es necesaria porque existen sustancias (v.g. ácido húmico, nucleasas) que afectan a la pureza del ADN e impedirán futuros ensayos, como la reacción en cadena de polimerasas (Tsai et al, 1992). Además, este ADN aislado y purificado debe poseer una longitud suficiente para mantener una identidad estructural de la secuencia o contener un marcador filogenético, que permita su futuro ensamblaje, asignación de filogenia, y permita además el estudio de clúster de genes (Simon y Daniel, 2009; Daniel, 2005).

La asignación de identidad de los fragmentos de ADN del metagenoma se realiza mediante dos estrategias, una es la amplificación y secuenciación de la región 16S ARNr y la otra estrategia es la secuenciación con la técnica *shotgun* (Simon y Daniel, 2009).

La elección del vector para clonar el ADN metagenómico dependerá de los objetivos del estudio y del tamaño de la metagenoteca con la que se desea trabajar. Si se desean clonar fragmentos de gran tamaño, se pueden utilizar: los cósmidos, poseen los extremos cohesivos *cos*, del bacteriófago *lambda*; los fósmidos, pueden albergar aproximadamente 40 Kb; los BAC's (Cromosomas Artificiales Bacterianos) pueden contener hasta 120 Kb de manera estable (Collins y Hohn, 1978; Jain y Srivastava, 2013). Si se desean clonar fragmentos de corto tamaño se suelen utilizar los plásmidos, compuestos por un *Ori*, una región de clonado múltiple, un promotor, una secuencia de interés, una secuencia terminadora, y una secuencia de andamio. La secuencia de interés se suele insertar en la región de clonado múltiple o interrumpiendo el gen reportero. Los insertos que puede recibir un plásmido de manera estable rondan los 15 Kb (Jain y Srivastava, 2013, Preston, 2003).

Luego de haber seleccionado el vector de clonación, se debe seleccionar un microorganismo hospedador. Estos suelen ser organismos modelo, cuyos requerimientos de crecimiento y genoma son bien conocidos y se pueden manipular con relativa flexibilidad. La elección de un microorganismo hospedador también dependerá de los objetivos del experimento. Los hospedadores suelen ser los siguientes. En primer lugar, *E. coli*. Es una bacteria gramnegativa que pertenece a la familia de las Enterobacteriaceae, ha sido utilizada como organismo modelo para múltiples experimentos debido al conocimiento de su genoma y su relativa facilidad de manipulación (Terpe, 2006). Se suele utilizar como hospedador para almacenar metagenotecas y para realizar los experimentos de cribado funcional o basados en secuencia. Presenta dificultades de expresión, debido a que el aparato transcripcional de *E. coli* a veces no es capaz de reconocer promotores; también si los promotores son inducibles solo en condiciones desfavorables para el crecimiento o supervivencia de *E. coli*, o se producen sustancias letales para *E. coli*, se disminuirá su capacidad de expresión. Por lo que se ha estimado que *E. coli* sería capaz de expresar solo el 40% de los genes presentes en un metagenoma. Además, *E. coli* forma cuerpos de inclusión con las proteínas producidas, requiriendo procesos de extracción y purificación (Gabor et al, 2004; Uchiyama y Miyazaki, 2009; Wang et al, 2000). *Streptomyces lividans* es una bacteria grampositiva perteneciente a la familia de las Streptomycetaceae, ubicada en el suelo. Se ha utilizado para la expresión heteróloga de genes provenientes de microorganismos que habitan el suelo. También tienen una mejor maquinaria de secreción extracelular, esto permite separar las bacterias del producto final, ahorrando procesos de extracción y permitiendo reutilizar los

microorganismos en lugar de reiniciar cultivos (Binnie et al, 1997). *Bacillus subtilis* es una bacteria grampositiva perteneciente a la familia de las Bacillaceae. Fue muy utilizada por las industrias de detergentes de limpieza y almidones, debido a la producción natural de proteasas, amilasas y fosfatasas alcalinas. Es un microorganismo GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Presenta una eficiente maquinaria de secreción extracelular en comparación con la *E. coli*, sin embargo, no es la favorita para la expresión heteróloga de productos farmacéuticos, donde ha mostrado una actividad proteasa desfavorable, y dificultades para un correcto ensamblaje de las proteínas expresadas (Westers et al, 2004). *Thermus thermophilus* es una bacteria gramnegativa perteneciente a la familia Thermaceae, habita ambientes con temperaturas altas. Es el sistema ideal de expresión heteróloga para genes provenientes de metagenomas de ambientes termófilos que han demostrado no expresarse en *E. coli*. Para su adaptación como sistema de expresión se ha construido el fósido pCT3FK que incluye dos regiones flanqueantes al locus pyr del *T. thermophilus*, permitiendo que se produzca una recombinación por homología en el genoma del mismo (Angelov et al, 2009).

1.3-Técnicas de cribado en metagenotecas

En general, se utilizan dos metodologías para la identificación de nuevos genes y enzimas: las técnicas de cribado basadas en secuencia y las técnicas de cribado basadas en función.

Las técnicas de cribado basadas en secuencia consisten en el uso de sondas que contienen secuencias conservadas de los genes que se están buscando. Se puede utilizar la técnica FISH (*fluorescent in situ hybridisation*) junto a la citometría de flujo, para aumentar la sensibilidad y poder separar los clones positivos dentro de una muestra que contiene miles de clones. El mayor inconveniente de esta técnica es el uso de formaldehído, por lo que ha sido sustituida por la PCR, donde estas sondas actúan como cebadores, hibridando con las secuencias que conserven más homología en los clones de la metagenoteca (Leveau, 2004). Un ejemplo práctico es la amplificación del gen ARNr 16 S para la identificación filogenética de los clones. Hoy en día existen herramientas bioinformáticas como MG-Rast (Meyer et al, 2008), que permite utilizar el análisis *subsystem* de todas las secuencias del metagenoma. Encuentra enzimas de interés, muestra sus secuencias y permite el diseño de cebadores que

teóricamente permiten amplificarlas. Asimismo, Meyer et al (2007) describe una técnica basada en la PCR, donde se utilizan sondas biotiniladas, que hibridarán con secuencias conservadas en genes de interés. Las amplificaciones son capturadas e inmovilizadas en microesferas magnéticas cubiertas de estreptavidina, permitiendo utilizar múltiples sondas en una misma reacción y capturar todos los genes amplificados.

Como el cribado basado en secuencia utiliza regiones conservadas como sondas, es difícil, sino imposible encontrar nuevos genes sin homología con los previamente conocidos. Sin embargo, permite hallar aquellos genes que no serían descubiertos mediante técnicas funcionales debido a las limitaciones propias del aparato transcripcional del hospedador u otras desventajas intrínsecas del sistema de expresión heterólogo (Lorenz et al, 2002).

Las técnicas de cribado funcional se fundamentan en exponer los productos proteínicos expresados por los clones de la metagenoteca, de una manera visible y diferenciable de aquellos que no poseen el genotipo de interés. Esta aproximación no requiere el conocimiento previo de las secuencias a encontrar y permite hallar genes totalmente nuevos (Handelsman, 2004). Su mayor limitación es la capacidad de expresión heteróloga de los microorganismos hospedadores. Sin mencionar la baja frecuencia de aislamiento de un clon que presente una función de interés (Rondon et al, 2000).

Para aumentar la sensibilidad del cribado funcional se han ideado diferentes estrategias como: uso de mutantes *knockout* para una función determinada que se desea aislar de los clones del metagenoma. De modo que sólo los que poseen el gen necesario podrán sobrevivir en el medio de cultivo. Similar a esta estrategia es el uso de antibióticos, permitiendo encontrar clones que posean genes de resistencia a antibióticos. También se utilizan medios de cultivo con sustratos especiales que al ser catabolizados producen un cambio de color o producen moléculas fluorescentes, apreciables alrededor de las colonias que contienen el gen de interés. Como la técnica SIGEX, en la que el gen de la *gfp* estará subordinado a la inducción del promotor del inserto (Handelsman, 2004; Simon y Daniel, 2011). También se ha desarrollado otra técnica de cribado funcional que aprovecha el uso de los genes del *quorum sensing*. Desarrollada en el 2005 por Williamson et al, permite detectar pequeños metabolitos que serían ignorados por la técnica SIGEX. Al igual que SIGEX, se emitirá fluorescencia cuando las moléculas alcancen la concentración suficiente para inducir a los

quorum sensing, se produzca *gfp* y se excite con la longitud de onda adecuada. Más recientemente, se describió la técnica de microgota en gel microfluídico, mediante la cual se separan clones individuales de una metagenoteca en emulsiones lipídicas (Hosokawa et al, 2015).

1.4-Metagenómica de microorganismos termófilos

La temperatura ejerce una presión selectiva muy fuerte sobre la biodiversidad en un hábitat. Por encima de los 60°C, la diversidad se reparte entre bacterias y arqueas. En la naturaleza, los nichos habituales donde se suelen encontrar tan elevadas temperaturas corresponden a manantiales de aguas termales, géisers y fumarolas hidrotermales. La mayoría de microorganismos que habitan estos sitios han demostrado ser incultivables, como sucede en el resto de hábitats extremófilos.

Existe mucha variabilidad de las condiciones físico-químicas entre las diferentes fuentes hidrotermales. Los manantiales cercanos a volcanes suelen tener un pH ácido, mientras que aquellos cercanos a roca caliza suelen ser alcalinos. Al igual que la temperatura, el pH también desempeña una fuerte presión selectiva sobre la biodiversidad de un hábitat. Por mencionar un ejemplo comparativo, en las aguas termales cercanas al volcán Mutnovsky, con pH 3.5-4 y 70°C, las clases predominantes fueron Gammaproteobacteria y Thermotogae, mientras que el manantial de la caldera de Uzon, con pH 7.2-7.4 y 81°C, las clases dominantes fueron Thermodesulfobacteria, Gammaproteobacteria y Betaproteobacteria (Wemheuer et al, 2013).

En estos hábitats hidrotermales se han predicho mediante análisis de las secuencias, enzimas encargadas de la degradación de almidón, celulosa, hemicelulosa y quitina como pullulasas, β -amilasas, α -amilasas, celulasas, xilanasas y quitinasas (Chan et al, 2015). Estas enzimas podrían tener aplicaciones importantes en actividades humanas y arrojan una pista sobre las funciones que desempeña cada organismo en este hábitat.

1.5-Metagenómica y la industria

Durante mucho tiempo, la industria se vio limitada al uso de enzimas elaboradas por microorganismos cultivables, como el *B. subtilis*. Este paradigma cambió con el desarrollo de la metagenómica, abriendo la puerta hacia una infinidad de productos bacterianos que se habían mantenido hasta entonces ocultos.

La biotecnología se apoyó en el uso de productos bacterianos (v.g. enzimas), para su desarrollo en áreas como la farmacéutica, industria agroalimentaria, industria textil, peletera, entre otras, generando beneficios de hasta 2.3 mil millones en el 2003 (GIA, 2004). La consultora McKinsey estimó que hasta el 60% de todos los productos químicos finos pueden elaborarse por técnicas bioquímicas apoyadas en el uso de la biotecnología (Schepens et al, 2003).

La industria, como cualquier otra actividad lucrativa, pretende producir el máximo de riquezas, en la mayor brevedad y con la menor inversión posible. Curiosamente, las bacterias son muy eficientes para producir grandes cantidades de biomoléculas de alto valor a partir de materias primas de menor valor y con menor impacto ambiental que su contraparte la síntesis química (Demain y Adrio, 2008).

El cambio en el paradigma de las industrias de síntesis química, que ha demostrado a lo largo de los años causar un mayor impacto ambiental, por el consumo de recursos y la producción de desechos tóxicos, hacia una práctica más sostenible basada en procesos bioquímicos apoyados en el uso de productos elaborados por microorganismos, se ha denominado "White Biotechnology" (Schepens et al, 2003).

Sin embargo, muchos de los procesos de elaboración industrial se llevan a cabo en condiciones desfavorables para los microorganismos y sus biomoléculas. Por suerte, existen microorganismos capaces de proliferar en condiciones extremas, estos son los extremófilos. Y si estos microorganismos son capaces de mantener su estabilidad estructural y bioquímica en condiciones de temperaturas muy elevadas o bajas, pH ácidos o alcalinos, altos valores barométricos y osmóticos, entonces las biomoléculas que ellos sintetizan deben poseer cualidades excepcionales. Lamentablemente, estos microorganismos no son en su mayoría cultivables, para bordear este problema, la biotecnología utilizó a la metagenómica.

Obteniéndose nuevas secuencias génicas que fueron clonadas en microorganismos fácilmente adaptables a condiciones de laboratorio o para la producción en masa (Oliart-Ros et al, 2016).

Dentro de los microorganismos extremófilos, se ha prestado especial atención a los termófilos y los hipertermófilos. Los primeros proliferan en temperaturas superiores a los 45°C y los segundos, por encima de los 80°C. Sus enzimas son especialmente útiles en la industria por su resistencia a altas temperaturas, a agentes caotrópicos, detergentes, solventes orgánicos y valores extremos de pH (Oliart-Ros et al, 2016).

1.6-Enzimas de interés industrial

La industria busca enzimas que se adapten a sus procesos de fabricación de manera eficiente y rentable. También es necesario obtener enzimas que no infringan la propiedad intelectual de la competencia. Para solventar este problema, se han buscado nuevas enzimas en fuentes metagenómicas de ambientes hostiles, donde las condiciones físico-químicas sean extremas, como los géisers, e incluso glaciares.

Las enzimas están clasificadas en seis clases generales, de acuerdo al Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, estas son: EC 1, corresponde a oxidorreductasas; EC 2, corresponde a transferasas; EC 3, corresponde a hidrolasas; EC 4, corresponde a liasas; EC 5, corresponde a isomerasas; EC 6, corresponde a ligasas.

Las enzimas hidrolíticas son una de las clases de enzimas que más aplicaciones poseen. Su uso está presente en la industria agroalimentaria, farmacéutica, cosmética, de detergentes, síntesis de biocombustibles, entre otras. En esta clase se encuentran las proteasas, lipasas, xilanasas, xilosidasas, esterases, amilasas, entre otras (Hasan et al, 2006).

Las feruloil esterases. Su nomenclatura es 4-hidroxi-3-metoxicinamoil hidrolasa (EC 3.1.1.73), son esterases capaces de catalizar la hidrólisis de ácidos hidroxicinámicos, compuestos que se encuentran en la pared celular de plantas, asociados a sacáridos como el arabinofuranósido (Figura 1). Los ácidos hidroxicinámicos se clasifican en ácido cinámico (a), o-cumárico (b), m-cumárico (c), p-cumárico (d), ferúlico (e), cafeínico (g), sinapínico (f) y clorogénico (h) (Figura 2). En un principio, las feruloil esterases se clasificaron en 4 grupos,

de manera empírica, basados en su afinidad por sustrato y por la identidad de su secuencia; más adelante fueron clasificadas en 12 familias por Udatha y colaboradores (Nishan Gopalan et al, 2015).

Las feruloil esterasas son producidas por hongos filamentosos y bacterias. Se han obtenido enzimas capaces de tolerar hasta 80°C, a partir de microorganismos como *Thermoanaerobacter tengcongensis*, con expresión heteróloga en *E. coli*. Además de la hidrólisis, estas enzimas son capaces de realizar transesterificaciones, combinando varios ácidos hidroxicinámicos (Varriale et al, 2018).

El ácido ferúlico es el ácido hidroxicinámico más abundante, tiene propiedades antioxidantes, tiene aplicación en cosméticos para elaborar bloqueadores solares, se ha utilizado para prevenir el cáncer de colon, tratar el Alzheimer, y en la elaboración del saborizante de vainilla, entre otras posibles aplicaciones (Gopalan et al, 2015).

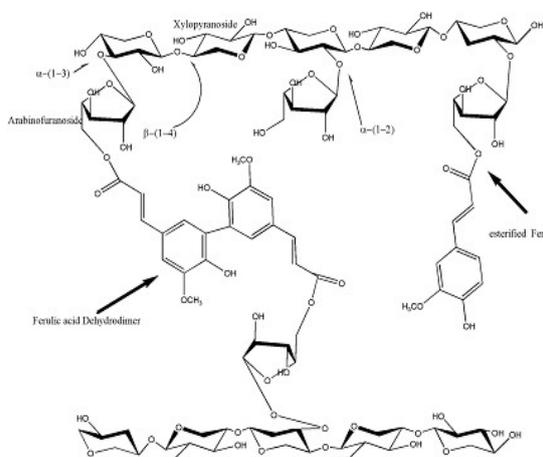


Fig. 1: Ubicación de ácidos ferúlicos en la pared celular (Gopalan et al, 2015)

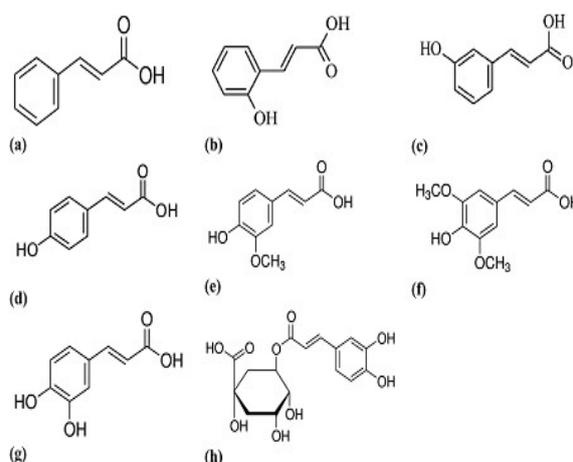


Fig. 2: Estructura molecular de ácidos hidroxicinámicos (Gopalan et al, 2015)

Las xilanasas. Su nomenclatura es β -1,4-endoxilanasas (EC 3.2.1.8). Son enzimas que catalizan la hidrólisis interna de los enlaces 1,4- β -D-xilosídicos en el xilano. Estas enzimas son muy útiles para aprovechar lignocelulosa, la cual resulta ser un residuo de actividades agrícolas, y un desecho forestal. La lignocelulosa hidrolizada con esta enzima resulta ser una fuente rentable y limpia de biocombustible. Se prefiere utilizar las enzimas extremófilas de microorganismos como *Thermotoga maritima*, porque resisten temperaturas de hasta 90°C o más. Además de las ventajas anteriormente mencionadas que ofrece el uso de termoenzimas,

una temperatura de 100°C aparenta ofrecer mejores resultados en el tratamiento de la lignocelulosa (Yu et al, 2016).

Las β -xilosidasas. Su nomenclatura es 1,4- β -D-xilan xilohidrolasa (EC 3.2.1.37). Es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces β -1,4 en oligosacáridos de xilano, o en la xilobiosa, liberando xilosa (Figura 3). Las β -xilosidasas son muy utilizadas en la industria del papel y la pulpa, también son útiles en conjunto con las xilanasas, para hidrolizar la hemicelulosa y obtener productos químicos finos (Sofijan et al, 2017). Las β -xilosidasas hidrolizan los enlaces 1,4 en las terminaciones no reductoras de los oligosacáridos de xilano que no pueden ser degradados por las endoxilanasas. Las β -xilosidasas pueden encontrarse en el espacio intracelular o extracelular (adheridas a la pared celular o excretadas en el medio), aunque en bacterias y levaduras suelen ser intracelulares (Knob et al, 2010).

Las β -xilosidasas pueden alternar su función hidrolítica con una función transglucosídica. Esto dependerá de si el sustrato es rico en cadenas cortas de oligosacáridos de xilano con terminaciones no reductoras o si hay abundante cantidad de monosacáridos de xilosa. Muestran actividad frente a p-nitrofenil- β -D-xilopiranosido y también pueden mostrar actividad frente a xilotriosa, xilotetraosa y más, sin embargo existen β -xilosidasas que solo son capaces de hidrolizar xilooligosacáridos de corta longitud, como la xilotriosa (Knob et al, 2010).

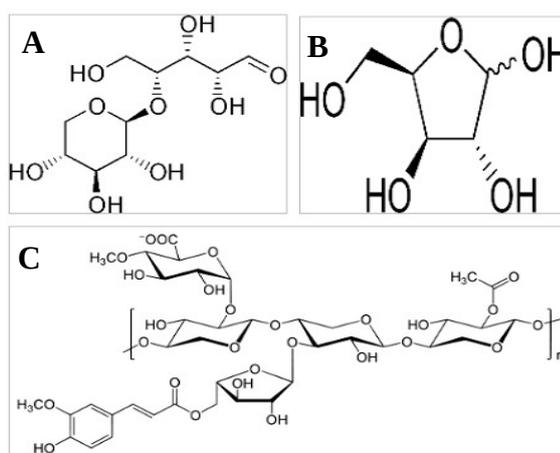


Fig. 3: A, xilobiosa. B, xilofuranósido. C, xilano

2-Objetivo general

Descubrir nuevas termoenzimas de interés industrial en fuentes geotermales de Galicia mediante metagenómica.

2.1-Objetivos específicos

Identificar genes que codifiquen enzimas feruloil esterasa en el metagenoma de aguas geotermales de Muiño Da Veiga y Río Caldo (Ourense) con técnicas de cribado funcional.

Aislar genes que codifiquen enzimas β -xilosidasa en el metagenoma de aguas geotermales de As Burgas (Ourense) con técnicas de cribado funcional.

3-Métodos

3.1-Condicionales de cultivo bacteriano

3.1.2-Cepa de *E. coli*

Las genotecas de los metagenomas de Muiño y As Burgas fueron albergadas en la cepa *E.coli* EPI 300TM- T1^R en el vector CopyControlTM pCC1FOS Vector de la casa comercial EPICENTRE; también se utilizó la cepa XL1Blue (Stratagene) para las transformaciones con el vector pJet 1.2 (Thermo Scientific) y pSmart (LUCIGEN).

La cepa EPI 300TM- T1^R ofrece la ventaja de presentar una eficiencia de transformación mayor que 5×10^8 ufc/ μ g de ADN si se utilizan 10 pg del vector pUC19 al hacerla competente por el método químico; es resistente a la infección por los fagos T1 y T5; contiene el gen *trfA*, con un promotor inducible por arabinosa, cuyo producto es necesario para estimular la replicación de los vectores que contengan un origen de replicación tipo *oriV*, entre otras ventajas. Las cepas XL1Blue son resistentes a la tetraciclina, deficientes del gen *recA* y carecen de las enzimas *endAI* y *EcoK*, dándole más estabilidad al inserto. Esta cepa se hizo competente con cloruro de calcio.

3.1.3-Medio de cultivo Luria-Bertani

Se elaboró medio LB compuesto de 1% de triptona, 0.5% de NaCl, 0.5% de extracto de levadura, 1.5% de agar, en los casos necesarios se añadió 0.02% de arabinosa. Se esterilizó en

autoclave y cuando la disolución se encontraba a una temperatura cercana a los 40°C, se agregó una concentración final de 0.0013% de cloranfenicol o 0.01% de ampicilina según el caso, se agitó suavemente para no producir burbujas y se vertió en placas de Petri estériles, dentro de una cámara de flujo laminar. Se identificaron las placas de Petri con la fecha y el contenido. También se elaboró medio LB líquido a iguales concentraciones, sin cloranfenicol, arabinosa o agar.

Para ensayos en medios LB con sustratos MUX se mezcló 1% de triptona, 0.5% de NaCl, 0.5% de extracto de levadura, 1.5% de agar, 0.04% de MUX (SIGMA-ALDRICH), en los casos necesarios se añadió 0.02% de arabinosa. Se autoclavó y cuando la temperatura se encontraba cercana a los 40°C, se agregó una concentración final de 0.0013% de cloranfenicol o 0.01% de ampicilina según el caso. Se agitó sin producir burbujas y se vertió en placas de Petri estériles, dentro de una cámara de flujo laminar. Se identificaron las placas de Petri con la fecha y el contenido, y se guardaron protegiéndolas de la luz con papel de aluminio hasta su uso posterior.

3.2-Cribado funcional en metagenotecas

3.2.1-Cribado funcional de feruloil esterasas

Se subcultivaron 6 placas de una genoteca proveniente de las termas de Muiño da Veiga, Ourense, que contenían 96 *pools* con clones variados. También se realizó el subcultivo de la genoteca proveniente de las aguas termales de Río Caldo, Ourense. Se cultivaron en LB con arabinosa y cloranfenicol, y se incubaron a 37° C durante 48 horas.

Se preparó sustrato cobertor que contenía 2.1% de agarosa y 0.02% de MUCMAC (SIGMA-ALDRICH), se mezcló y calentó en horno microondas hasta que se disolvió la totalidad de la agarosa. Se dejó enfriar sin que llegase a polimerizar y se cubrió de la luz con papel de aluminio.

Se inoculó 2 µL de enzima feruloil esterasa como control positivo en una de las placas de Petri de la genoteca de Muiño Da Veiga, se esperó a que seicara y se vertió el sustrato cobertor sobre cada una de las placas de las genotecas. Las placas de Petri con el sustrato cobertor se incubaron a 37°C durante 30 minutos, protegidas de la luz con papel de aluminio, luego se revelaron en un cañón de luz ultravioleta de la marca BIO-RAD.

3.2.2-Cribado funcional de β -xilosidasas

A partir de la genoteca del metagenoma de las aguas termales de As Burgas, se seleccionaron los pocillos B5 y C5, los cuales habían sido identificados previamente con la capacidad de hidrolizar el sustrato fluorescente MUX. Se prepararon diluciones seriadas en medio LB líquido hasta obtener una dilución de 10^{-6} y 10^{-7} . Se tomaron las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} de las muestras B5 y C5, se inocularon cada una en una placa de Petri con medio LB, cloranfenicol y arabinosa, y se diseminaron de manera homogénea por toda la placa para obtener colonias aisladas. Se incubaron a 37° C durante 24 horas.

Se seleccionaron 50 colonias de los cultivos con las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} , pertenecientes a la muestra B5 y utilizando palillos estériles, se sembraron en réplica en placas con medio LB, arabinosa, cloranfenicol y MUX. Se cuadrícularon y enumeraron, tanto una placa con sustrato MUX como una placa sin sustrato para cada dilución de cada muestra. Con el mismo palillo se inoculó una colonia seleccionada en su casilla correspondiente en la placa con sustrato y en la placa sin sustrato, este paso se repitió para ambas diluciones de ambas muestras. Se incubaron durante 24 horas a 37° C, las placas que contenían MUX fueron protegidas de la luz con papel de aluminio. A las 24 horas, las placas que contenían el sustrato MUX fueron reveladas en un cañón de luz ultravioleta de la casa comercial BIO-RAD.

3.2.3-Ensayo de purificación y secuenciación del ADN

Se realizaron dos cultivos en medio líquido de LB, arabinosa y cloranfenicol; se seleccionaron 2 colonias que habían mostrado actividad β -xilosidasa o la capacidad de hidrolizar en el medio el sustrato fluorescente MUX y se incubaron a 37° C durante 24 horas, en agitación a 250 r.p.m. A las 24 horas se midió la densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) para confirmar que ambos cultivos tuviesen una absorbancia de 0.3 a 0.4.

Se procedió a purificar el ADN de las bacterias cultivadas, específicamente el fósido pCT3FK que contiene el inserto con el gen de interés, según el protocolo del FosmidMax™ DNA purification kit de la casa comercial EPICENTRE. Se siguieron los siguientes pasos:

1. Se partió de 1.5 mL de cultivo líquido en un tubo de microcentrífuga, centrifugado a 13,000 r.p.m. durante 3 minutos y decantado el sobrenadante, quedándonos solo con el pellet.
2. Se agregó 200 μ L de la solución 1 y se resuspendió utilizando el vórtex.
3. Se agregó 400 μ L de solución 2 que lisa las bacterias, se invirtió 3 a 4 veces para mezclar de manera homogénea.
4. Se agregó 300 μ L de solución 3, que actúa como neutralizante y permite que precipiten las proteínas. Se invirtió el tubo varias veces y se incubó en hielo durante 15 minutos. Luego se centrifugó durante 15 minutos a 13,000 r.p.m a 4°C.
5. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga sin tocar el pellet, se le añadió 540 μ L de isopropanol, se mezcló invirtiendo varias veces, se centrifugó a 13,000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Luego, se retiró el isopropanol con una pipeta y se dejó evaporar durante 5 minutos el tubo de microcentrífuga.
6. Se le añadió 250 μ L de solución TE al tubo de microcentrífuga para resuspender el ADN. Luego, se le añadió 250 μ L de solución 4, se mezcló y se incubó durante 15 minutos en hielo.
7. Se centrifugó a 13,000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga, se le añadió 1 mL de etanol absoluto y se mezcló.
8. Se volvió a centrifugar a 13,000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Se retiró el etanol y se dejó secar el tubo de microcentrífuga durante 5 minutos.
9. Se resuspendió en 25 μ L de H₂O bidestilada estéril, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, luego se añadió 1 μ L de *RiboShredder Rnase Blend* y se incubó a 37°C durante 30 minutos.
10. Se midió la absorbancia del ADN *ds* a 260 nm en espectrofotómetro y se conservaron alícuotas de 12 μ L en refrigerador a -20°C.

Se utilizaron alícuotas que contuvieran al menos 100 μ g de ADN purificado y utilizando los cebadores específicos del fósido pCT3FK, se enviaron a la unidad de biología molecular del SAI de la Universidad de la Coruña.

3.2.4-Identidad del ADN

Los electroferogramas de las secuencias obtenidas del cebador KOForward 5' CGACGGCCAGTGCCAAGCTTGC 3' y del cebador T7 Reverse 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3' fueron observadas con el programa bioinformático BioEdit v7.2.6 (Hall, 1999). Se seleccionaron las partes de la secuencia que presentaban mejor resolución de nucleótidos. Estas secuencias fueron comparadas con las secuencias existentes en las bases de datos de la NCBI, utilizando la herramienta bioinformática Blastn (Altschul et al, 1990).

Las secuencias fueron copiadas y pegadas en el "*Enter Query Sequence*", todas las demás opciones se dejaron por defecto y se dio clic en el botón Blast. El programa arrojó un conjunto de resultados; se seleccionó el resultado que presentó el mayor porcentaje de identidad, el menor valor de E y que alineara la mayor cantidad de bases posibles, obteniendo la puntuación más alta.

3.2.5-Separación de la fracción intracelular y la fracción extracelular

Se separaron las fracciones intracelulares y las extracelulares de dos clones que mostraron la capacidad de hidrolizar el sustrato MUX. Primero se preparó el tampón de sonicación mezclando 0.94 g de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 0.61 g de Tris y 0.15 g de NaCl en 100 ml de H₂O bidestilada, y se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos; segundo, se realizaron dos cultivos líquidos en medio LB con arabinosa y cloranfenicol con las colonias seleccionadas; tercero, se centrifugó el cultivo a 5,000 r.p.m, durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se separó, constituyendo la fracción extracelular, y el pellet fue resuspendido en tampón de sonicación (Tris-EDTA-Salino); cuarto, se sometió a sonicación con los siguientes parámetros 100% amplitud, 2 segundos "on" y 8 segundos "off", hasta que cumplió 5 minutos en "on". Luego se centrifugó a 5,000 r.p.m, durante 15 minutos a 4°C; este nuevo sobrenadante constituye la fracción intracelular (Hopkins, 1991).

3.2.6-Ensayo de actividad enzimática a punto final

Se prepararon 42 tubos de microcentrífuga, debido a que se trabajó con dos muestras diferentes. Se realizaron 2 blancos por cada temperatura de ensayo. El ensayo se realizó a

35°C, 45°C y 65°C, por triplicado para cada temperatura y cada muestra. Primero se utilizó un protocolo (protocolo A) en el cual, cada tubo de microcentrífuga contenía: tampón fosfato potásico 0.1 M 100 µL, sustrato 4-nitrofenil-β-D-xilopiranosido (SIGMA-ALDRICH) 2.5 mg/mL 80 µL, muestra 20 µL. La muestra se añadió cuando los tubos con el resto de elementos habían sido incubados a la temperatura adecuada durante un minuto. Luego de añadir la muestra, la reacción se detuvo cuando se cumplieron 20 minutos de incubación, añadiendo carbonato ácido de sodio (Na₂CO₃) 2% 100 µL. Se utilizó un segundo protocolo (protocolo B) que contenía los siguientes volúmenes: PNPX 5 mM 100 µL, tampón fosfato potásico 1 mL o 0.1 M 300 µL, muestra 100 µL; se siguió el mismo protocolo antes mencionado, la reacción se detuvo con carbonato ácido de sodio (Na₂CO₃) 1 M. Los blancos contenían H₂O destilada en lugar de muestra.

La medición se llevó a cabo mediante espectrofotometría, se utilizó una placa con pocillos identificados por números y letras del alfabeto, se agregó 300 µL de cada ensayo en su pocillo correspondiente y se midió la absorbancia a 410 nm.

3.2.7-Identificación de actividad β-xilosidasa en las fracciones celulares con sustrato MUX

Se utilizó una placa de Petri con medio LB, cloranfenicol, arabinosa y sustrato MUX para comprobar en cuál fracción celular se encuentra la actividad β-xilosidasa o la enzima capaz de hidrolizar el sustrato MUX. Se inocularon 10 µL de la fracción intracelular y 10 µL de la fracción extracelular en la placa y se identificó cada una, también se sembró, como control positivo, el clon que había mostrado la capacidad de hidrolizar el sustrato MUX, del cual se habían extraído las fracciones celulares. Se incubó a 37°C durante 24 horas, protegida de la luz con papel de aluminio. Luego se reveló la placa en un cañón de luz ultravioleta de la casa comercial BIO-RAD.

Se repitió el mismo experimento, utilizando una placa de Petri con medio LB, arabinosa, cloranfenicol y sustrato MUX. Se inocularon 10 µL de la fracción intracelular, 10 µL de la fracción extracelular, en sitios separados y se identificaron. Se sembraron tres clones, de los cuales dos habían mostrado la capacidad de hidrolizar el sustrato MUX en placa y un tercero como control negativo. La placa se incubó a 37°C durante 24 horas, protegida de la luz con papel de aluminio. A las 24 horas, se inoculó 1 U de enzima exo-1,4-β-D-xilosidasa

(Megazyme), se dejó incubar 30 minutos más a la misma temperatura y luego se reveló en un cañón de luz ultravioleta de la casa comercial BIO-RAD.

3.2.8-Ensayos de digestión con enzimas de restricción específica

Conociendo la secuencia del fósido pCT3FK (Angelov et al, 2009) y utilizando las secuencias obtenidas mediante la secuenciación del inserto, se utilizó la herramienta informática “Nebcutter” que ofrece la casa comercial New England Biolabs (Vincze et al, 2003), y se buscaron enzimas que fueran capaces de cortar el inserto en fragmentos de un tamaño adecuado para ser subclonado en un vector de expresión y que tenga la longitud suficiente para contener al gen que codifica la enzima β -xilosidasa.

Se utilizó el ADN purificado de las bacterias que contienen al pCT3FK con el inserto de interés. Se trabajó con la enzima AatII (TAKARA) de corte único en el inserto y NheI (New England Biolabs) de doble corte en el inserto. Se realizó una digestión doble. En un microtubo para PCR se añadió: tampón T 10x (330 mM Tris-acetato pH 7.9, 100 mM Mg-acetato, 5 mM ditiotreitól, 660 mM K-acetato) 2 μ L, 0.1% BSA 2 μ L, muestra de ADN 1 ng/1,6 μ L, H₂O bidestilada estéril 13,6 μ L, AatII 1 μ L, se incubó a 37° C durante una hora, la enzima se inactivó a 70°C durante 15 minutos. Antes de incubarlos, la mezcla fue centrifugada durante 2 segundos. Luego, se añadió tampón Ne 2,1 10X (500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 1mg/mL BSA) 5 μ L, enzima NheI 10 U/1 μ L. Se incubó a 37°C durante una hora, luego se inactivó la enzima a 65°C durante 20 minutos.

Se llevaron a cabo dos reacciones de digestión del fósido pCT3FK de manera independiente con las enzimas NheI y HpaI, ambas de la casa comercial New England Biolabs. Para cada reacción se utilizaron 5 μ L de tampón Ne 2.1 10x, 1.6 μ L de Muestra de ADN, 1 μ L de enzima y 42.4 μ L de H₂O bidestilada estéril. La digestión con NheI se incubó a 3°C durante una hora, luego se inactivó 65°C durante 20 minutos. La digestión con HpaI se incubó a 37°C durante una hora, luego se realizó una precipitación alcohólica del ADN para eliminar la enzima.

Se repitió la digestión del ADN del fósido pCT3FK utilizando las enzimas Cla I y Mlu I de la casa comercial TAKARA. Se llevaron a cabo de manera independiente en dos microtubos de PCR. Se agregó 1 μ L de muestra de ADN, 2 μ L de tampón M 10x (100mM

Tris-Hcl pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 10 mM ditioneitol, 500 mM NaCl), 1 µL de enzima, 16 µL de H₂O bidestilada estéril. Para la enzima Mlu I se utilizó tampón H 10x (500 mM Tris-Hcl pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 10 mM ditioneitol, 1,000 mM NaCl). La reacción se incubó a 30°C para Cla I, y a 37°C para Mlu I, durante una hora ambas. Cla I se inactivó a 60°C durante 15 minutos y Mlu I a 80° C durante 20 minutos.

3.3-Elaboración de electroforesis en gel de agarosa al 0.7%

Para comprobar el resultado de las digestiones, subclonaciones y amplificaciones de PCR, se realizaron varias electroforesis en gel de agarosa 0,7%. Para ello se pesó y mezcló: 350 mg de agarosa, 50 mL de tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE), se calentó hasta lograr la completa disolución de la agarosa. Se dejó enfriar durante 5 minutos y se vertió en un molde para gel de agarosa de 10 cm de largo, con un peine de 8 a 15 pocillos. Se dejó enfriar y polimerizar durante 40 minutos, se retiró el peine y se colocó el molde con el gel en una cubeta horizontal llena con tampón TAE, colocando los pocillos del lado del polo negativo y con suficiente tampón como para llenar los pocillos y cubrir el gel.

Los pocillos se cargaron con 10 µL que contenía 7.5 µL de ADN y 2.5 µL de Gel Green, como agente intercalante para la posterior visualización de las bandas. También se mezcló 7.5 µL de marcador con 2.5 µL de Gel Green. La electroforesis se realizó a 65 V, durante 2 horas. Luego el gel se colocó en un cañón de luz ultravioleta de la Marca BIO-RAD para su posterior revelado.

3.3.1-Ensayo de ligación en los vectores pSmart y pJet 1.2

Se realizó un ensayo de ligación con las muestras de ADN, que habían sido digeridas con las enzimas de restricción específica, con los vectores pSmart y el pJet 1.2.

El vector pJet 1.2 posee una longitud de 2,974 pares bases, acepta insertos con bordes romos de una longitud máxima de 5,000 pb. Contiene el gen *bla* (Ap^R) de resistencia a la ampicilina, también posee el promotor *lacUV5* y el promotor T7 para la expresión del gen insertado en la región de clonado múltiple y contiene el gen letal *eco47IR*, que permite la selección de las bacterias que han sido correctamente transformadas con el vector ligado.

Para ligar el ADN con el vector pJet 1.2, se realizó sobre hielo en microtubo de PCR la adición de 10 μL de tampón de reacción 2X, 7 μL de H_2O bidestilada estéril, 1 μL de enzima para corte romo del ADN (cuando los extremos del ADN son cohesivos), 1 μL de ADN o cantidad suficiente para conseguir una relación ADN-vector de 3:1. Se centrifugó durante 5 segundos, luego se incubó a 70°C durante 5 minutos, luego se dejó enfriar sobre hielo. Se añadió 1 μL de pJet 1.2 blunt cloning vector que viene a una concentración de 50 ng/ μL , 1 μL de ligasa de ADN T4. Se volvió a centrifugar durante 5 segundos y se incubó a 22°C durante 20 minutos, debido a que el fragmento de ADN superaba las 3 kilobases.

El vector pSmart que se utilizó fue pSMART HCAmp de 1,833 pares de bases de longitud, acepta insertos de 4,000 pb máximo, de extremos romos. Contiene un gen de resistencia a la ampicilina y no contiene región promotora para el gen o fragmento de ADN que se inserte en su región de clonado múltiple, también posee varias regiones terminadoras entre el origen de replicación, la región de clonado múltiple y el gen de resistencia a la ampicilina.

Para ligar el ADN con el pSmart vector cloning, se añadió en un microtubo de PCR 100-500 ng de ADN, 1 μL de H_2O bidestilada estéril, 2.5 μL de 4x cloning Smart premix que fue previamente centrifugado durante 5 segundos y 1 μL de cloning Smart ligasa de ADN. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, luego se inactivó la enzima de ligación incubando la mezcla a 70°C durante 15 minutos. Se enfrió 15 segundos a temperatura ambiente y 15 segundos sobre hielo, por último se centrifugó a 12,000 r.p.m. y se conservó a -20°C hasta su posterior uso.

3.3.2-Ensayo de transformación de *E. coli* competentes con los vectores pJet 1.2 y pSmart

Se utilizaron cepas de *E. coli* que habían sido previamente tratadas con cloruro de calcio. Para la transformación con pJet 1.2, las alícuotas con las bacterias competentes se mantuvieron sobre hielo. Se mezclaron 20 μL del vector clonado pJet 1.2 con la alícuota de *E.coli* competente. Se incubó 30 minutos en hielo, luego se incubó a 42°C durante 90 segundos y se volvió a colocar en hielo por un minuto. La alícuota usualmente contiene un volumen de 100 μL , a este se le añadió 900 μL de medio LB líquido y se incubó a 37°C durante 40 minutos en agitación. Una vez terminada la recuperación, se centrifugó a 5,000

r.p.m. durante 5 minutos, se decantó la mayor parte del sobrenadante y se resuspendió en el volumen residual agitando en vórtex. Por último, se inoculó todo el volumen sobre una placa de Petri con medio LB y ampicilina, y se incubó a 37°C durante 24 horas.

Para la transformación con pSmart, se colocó el tubo de microcentrífuga sobre hielo unos 10 minutos antes de empezar el ensayo. Las alícuotas con *E. coli* competentes fueron incubadas en hielo durante 10 minutos para que se descongelaran paulativamente. Pasado este tiempo, se añadió 40 µL de bacterias competentes al tubo de microcentrífuga, 1 µL de vector pSmart clonado, mezclando con la punta de la pipeta. Se incubó en hielo durante 30 minutos, luego se incubó a 42°C durante 90 segundos, posteriormente se incubó en hielo durante 1 minuto. Se le añadió 960 µL de medio LB y se incubó a 37°C durante 40 minutos en agitación. Pasado este tiempo, se centrifugó, se decantaron 900 µL del sobrenadante, se resuspendió con vórtex y se inoculó en una placa de Petri con medio LB y ampicilina. Se incubó a 37°C durante 24 horas.

3.3.3-Cribado funcional de subclones con actividad β-xilosidasa

Se subcultivaron cuatro subclones que contenían insertos de diferentes longitudes en una placa de Petri con medio LBA y sustrato MUX; se identificó cada región en la que fue sembrado el subclón y se incubó a 37°C durante 24 horas, protegida de la luz con papel de aluminio. A las 24 horas se reveló la placa en un cañón de luz ultravioleta de la casa comercial BIO-RAD.

3.3.4-Ensayo de PCR de colonias

Se realizó una PCR con las colonias de *E. coli* transformadas con el vector de expresión pJet 1.2 y con el pSmart. Ambas amplificaciones siguieron los mismos ciclos de temperatura: 3 minutos a 95°C, 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C, 30 segundos a 72°C, estos tres últimos pasos repitiéndose 25 veces, por último 5 minutos a 75°C para culminar la elongación.

Para la reacción con el vector pJet 1.2 se utilizó 2 µL de tampón taq 10x, 1.6 µL de mezcla de dNTPs 2,5 mM, 4 µL pJet 1.2 reverse primer 1 mM, 4 µL de pJet 1.2 forward primer 1 mM, 0.5 µL de Taq polimerasa 1 U/µL, 11.9 µL de H₂O bidestilada estéril, muestra

de colonia sin medio de cultivo. Se mezcló todo en un microtubo de PCR y se centrifugó durante 5 segundos. La secuencia del cebador Forward es 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3', y la del Reverse es 5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'.

Para la reacción con el vector pSmart se utilizó 2 µL de tampón taq 10x, 1.6 µL de mezcla de dNTPs 2.5 mM, 0.2 µL de pSmart forward primer 20 mM, 0.2 µL de pSmart reverse primer 20 mM, 0.5 µL de Taq polimerasa 1 U/µL, 15.5 µL de H₂O bidestilada estéril, muestra de colonia sin medio de cultivo. La secuencia del cebador Forward es 5'-CAGTCCAGTTACGCTGGAGTC-3', y la del Reverse es 5'-GGTCAGGTATGATTTAAATGGTCA GT-3'.

3.3.5-Ensayo de purificación y secuenciación del ADN

Se cultivaron bacterias *E. coli* transformadas con los vectores de expresión pJet 1.2 y pSmart en medio líquido LBA a 37°C durante 24 horas en agitación. Se midió la OD 600 para confirmar que hubiese una absorbancia entre 0.3 y 0.4 antes de proceder con el protocolo de purificación.

Se utilizó el GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) para la purificación del ADN. Se tomaron dos muestras de 5 mL y se centrifugó a 5,000 r.p.m. durante 5 minutos en tubos de 12 mL. Se eliminó el sobrenadante con pipeta, sin tocar el pellet. Se añadió 250 µL de solución de resuspensión, se resuspendió utilizando la pipeta y se travesó todo el contenido a un tubo de microcentrífuga con capacidad de 1.7 mL. Se añadió 250 µL de solución de lisis, mezclándose por inversión unas 4 veces con cuidado. Posterior a esto, se añadió 350 µL de solución de neutralización, mezclándose por inversión unas 4 veces. Se centrifugó a 13,000 r.p.m. durante 5 minutos.

El sobrenadante fue retirado con pipeta sin alterar el pellet, y se vertió sobre las GeneJET Spin Column, luego se centrifugó a 13,000 r.p.m. durante 1 minuto. Se decantó el líquido que atravesó la membrana y se le añadió 500 µL de solución de lavado, se centrifugó durante 1 minuto a las mismas revoluciones y se decantó el líquido que atravesó la membrana, este paso se repitió una vez más.

Por último, la columna se colocó en un tubo de microcentrífuga, se añadió 50 μL de H_2O , se dejó incubar durante 2 minutos y se centrifugó durante 2 minutos a 13,000 r.p.m. Se midió el rendimiento del ADN purificado mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm. Se conservó el resto de ADN a -20°C .

Se utilizaron alicuotas que contuvieran al menos 100 μg de ADN purificado y utilizando los cebadores específicos para el pJet 1.2 y el pSmart, se enviaron al SAI las muestras que presentaron patrones de bandas distintos en la electroforesis en gel de agarosa 0.7 % para su secuenciación. La identidad de las secuencias se obtuvo de la manera antes descrita para el fósido pCT3FK.

3.3.6-Identificación de actividad β -xilosidasa en las fracciones celulares mediante cromatografía líquida de alta eficacia

Se realizó un ensayo enzimático utilizando la fracción intracelular y extracelular de un clon positivo en placa con MUX, y xilotriosa como sustrato.

1. Se prepararon 10 tubos de microcentrífuga con la siguiente composición:
2. 3 tubos de microcentrífuga con 200 μL de fracción intracelular, 200 μL de xilotriosa 0.5 mg/mL y 600 μL de tampón fosfato potásico 0.1 M.
3. 3 tubos de microcentrífuga con 200 μL de fracción extracelular, 200 μL de xilotriosa 0.5 mg/mL y 600 μL de tampón fosfato potásico 0.1 M.
4. 1 tubo de microcentrífuga con 9 μL de la enzima exo-1,4- β -D-xilosidasa (1 U) en 191 μL de Seroalbumina bovina (BSA) 1 mg/mL, 200 μL de xilotriosa 0.5 mg/mL y 600 μL de tampón fosfato potásico 0.1 M. Se utilizó como control positivo.
5. 1 tubo microcentrífuga con 200 μL de H_2O bidestilada estéril, 200 μL de xilotriosa 0.5 mg/mL y 600 μL de tampón fosfato potásico 0.1 M. Se utilizó como control negativo.
6. 1 tubo microcentrífuga con 800 μL de H_2O bidestilada estéril y 200 μL de xilotriosa 0.5 mg/mL.
7. 1 tubo microcentrífuga con 400 μL de H_2O bidestilada estéril y 600 μL de tampón fosfato potásico 0.1 M.

Los ensayos se incubaron a 37°C durante 24, 48 y 72 horas y luego se detuvieron a 100°C durante 5 minutos, siempre se detuvo un ensayo con una fracción intracelular y otro ensayo con la fracción extracelular. El control negativo se incubó hasta 72 horas, el control positivo se incubó durante una hora, al igual que las muestras que contenían solo el tampón o el sustrato xilotriosa. En la medida en que fueron detenidos los ensayos, se congelaron para su posterior uso.

Cuando se habían detenido todos los ensayos, se descongelaron y se filtraron con filtros de 0.22 µm de diámetro, depositando el filtrado en un vial especial para HPLC e identificando la muestra que contenía. Se calibraron los aparatos del HPLC compuesto por Waters 2414 Refractive Index Detector, Waters 1515 Isocratic HPLC Pump y Waters 2707 Autosampler, utilizando un vial con film cubriendo la boca, para conocer si la punta de inyección estaba centrada, se seleccionó la secuencia en que iba a tomar las muestras, la columna Sugar Pak I de Waters se dejó equilibrar durante 2 horas con la fase móvil, constituida por H₂O bidestilada estéril y se colocaron los viales en el orden adecuado dentro de la gradilla. Los datos fueron procesados por un modelo preestablecido, que identifica los diferentes tiempos de retención de los sacáridos y se dejó ejecutando.

3.3.7-Ensayo de actividad enzimática bacteriana en sustrato PNPX

Para comprobar que los clones con actividad en sustrato MUX conservan la actividad en sustrato colorimétrico PNPX, se realizaron cultivos bacterianos por triplicado en medio LB líquido conteniendo PNPX a una concentración final de 5 mM. El medio de cultivo con los clones positivos contenía además arabinosa y cloranfenicol en las concentraciones antes descritas. Se utilizó un blanco que solo contenía medio 200 µL de LB líquido y PNPX 5 mM. El control negativo contenía medio 200 µL LB líquido, PNPX 5 mM y bacterias *E. coli* EPI 300 T1^R sin transformar. Como control positivo se utilizó 200 µL de medio LB líquido con PNPX 5 mM y 1 U de exo-1,4-β-D-xilosidasa en 9 µL de BSA 1 mg/mL.

Cada muestra se hizo por triplicado en una placa de 96 pocillos; los clones, blancos y controles negativos se incubaron a 37°C durante 72 horas en agitación a 250 r.p.m. El control positivo se incubó a 37°C durante 1 hora. Pasadas las 72 horas de incubación, cada muestra fue trasladada a un tubo de microcentrifuga respectivo, se identificaron y se centrifugaron a

13, 000 r.p.m., durante 3 minutos. Se tomaron 50 μ L de cada muestra y se depositaron en pocillos correspondientes y se hizo una dilución 1:1 con H₂O destilada para cada muestra excepto para el control positivo, cuya dilución fue 1:10. Se introdujo la placa de 96 pocillos en el espectrofotómetro y se midió la absorbancia a 410 nm.

4-Resultados

4.1-Cribado funcional de enzimas feruloil esterasas

Los clones de las genotecas de metagenoma provenientes de las termas de Muiño da Veiga y Río Caldo, Ourense, no fueron capaces de hidrolizar el sustrato MUCMAC por acción de una enzima feruloil esterasa, liberando la molécula fluorescente metil umbeliferona, como vemos en la Figura 4. Si hubiesen sido positivas se observaría un halo difuso de fluorescencia alrededor de las colonias al exponerlas a la luz ultravioleta.

4.2-Cribado funcional de enzimas β -xilosidasas

Se seleccionaron los pocillos B5 y C5 de la genoteca de metagenoma de la terma de As Burgas, debido a que se había comprobado que en estos pocillos existían clones con la capacidad de hidrolizar el sustrato MUX, aunque no se habían aislado a los clones responsables.

Se observó fluorescencia alrededor de las colonias 6, 13, 19, 37, 40 y 50, al exponerlas a la luz ultravioleta. Todos son clones del pocillo C5 de la genoteca de metagenoma de las termas de As Burgas (Figura 5). La presencia de fluorescencia indica la hidrólisis del sustrato fluorescente MUX por una enzima β -xilosidasa o una glucosidasa, que libera al metil umberiferona. También se observó fluorescencia alrededor de las colonias 5, 6, 12, 13, 14, 22, 23, 31, 32 y 47, al exponerlas a la luz ultravioleta. Todos son clones del pocillo B5 de la genoteca de metagenoma de las termas de As Burgas (Figura 6). La fluorescencia fue más pronunciada en algunos clones que en otros, lo que significa que pueden existir más clones con la capacidad de producir una enzima que hidrolice el sustrato MUX, pero cuya intensidad sea opacada por la intensidad de los demás.



Fig. 4: Cultivo de los clones de la metagenoteca de Muiño da Veiga en presencia de sustrato MUCMAC



Fig. 5: Clones del pocillo C5 en sustrato MUX, este produce fluorescencia al ser hidrolizado por una enzima β -xilosidasa.xilosidasa.



Fig. 6: Clones del pocillo B5 en sustrato MUX, este produce fluorescencia al ser hidrolizado por una enzima β -xilosidasa.xilosidasa.

4.2.1-Identificación de la fracción celular que contiene la enzima β -xilosidasa con sustrato colorimétrico PNPX

En presencia de una enzima β -xilosidasa, el sustrato PNPX produce un color amarillo en la disolución, al excitarse con luz a una longitud de onda de 410 nm, debido a la liberación del 4-nitrofenil. No se encontró actividad β -xilosidasa en la fracción intracelular (FI) o extracelular (FE) del clon B5-12, tampoco del clon C5-37, utilizando el protocolo A y el protocolo B (ver sección 3.2.5 de Métodos); si se compara con el control positivo, 1 U de la enzima exo-1,4- β -D-xilosidasa de *Bacillus pumilus* (Megazyme), cuyo resultado fue 9.5 de absorbancia a 410 nm, incubado a 35°C durante 1 hora (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Ensayo enzimático colorimétrico protocolo A

Temperaturas	Absorbancias B5-12		Absorbancias C5-37	
	FI	FE	FI	FE
35°C	(\pm 0.005) 0.016	(\pm 0.003) 0.016	(\pm 0.002) 0.014	(\pm 0.002) 0.008
50°C	(\pm 0.001) 0.011	(\pm 0.005) 0.017	(\pm 0.021) 0.034	(\pm 0.004) 0.018
65°C	(\pm 0.004) 0.020	(\pm 0.004) 0.020	(\pm 0.001) 0.031	(\pm 0.001) 0.022

Tabla 2. Ensayo enzimático colorimétrico protocolo B

Temperaturas	Absorbancias B5-12		Absorbancias C5-37	
	FI	FE	FI	FE
35°C	(±0.006) -0.011	(±0.005) -0.011	(±0.002) -0.005	(±0.016) 0.004
50°C	(±0.002) 0.001	(±0.001) 0.006	(±0.004) 0.007	(±0.001) 0.002
65°C	(±0.002) 0.002	(±0.005) 0.006	(±0.003) 0.009	(±0.003) 0.006

4.2.2-Identificación de la fracción celular que contiene la enzima β -xilosidasa con sustrato fluorescente MUX

Como no se encontró cual fracción celular contiene la enzima β -xilosidasa mediante ensayos enzimáticos colorimétricos, se decidió utilizar una placa con medio LB, cloranfenicol, arabinosa y sustrato MUX, comparando la actividad del clon B5-12 con su fracción intracelular y extracelular. Resultando en la no observación de fluorescencia en los sitios donde fueron inoculadas la FE y la FI, pero sí se continúa observando fluorescencia alrededor del clon B5-12 (Figura 7).

Se decidió comparar la actividad del clon B5-12, su fracción intracelular y extracelular con la actividad de la enzima exo-1,4- β -D-xilosidasa de *B. pumilus* (Megazyme), en placa LB con arabinosa, cloranfenicol y sustrato fluorescente MUX. Se observó que la hidrólisis del control positivo es superior a aquella observada en el clon B5-12 y B5-25. La FE y FI continúan sin mostrar actividad β -xilosidasa sobre el sustrato fluorescente y se sospecha que la cantidad de enzima producida por los clones en cultivo líquido es muy escasa, quedando muy diluída para observarse alguna actividad, más si se toma en cuenta que las colonias en placa producen una señal fluorescente inferior a la producida por 1 U enzimática. El clon C5-37 no creció en esta nueva placa debido a que se tomó de un cultivo viejo (Figura 8 y 9).

4.2.3-Identificación de la fracción celular que contiene la enzima β -xilosidasa mediante el uso de la cromatografía líquida de alta eficacia

Como aún no era posible determinar en que fracción celular se encontraba la enzima capaz de hidrolizar el sustrato fluorescente MUX, se decidió realizar un ensayo enzimático utilizando xilotriosa como sustrato e incubando durante 24, 48 y 72 horas a 37°C, para luego buscar el producto del ensayo con el HPLC e identificar la presencia de xilosa en algunas de

las fracciones. No se encontró un pico correspondiente a la xilosa en ninguno de los ensayos conteniendo las fracciones intracelulares y extracelulares durante las diferentes horas, mientras que el control positivo compuesto por la enzima exo-1,4- β -D-xilosidasa de *B. pumilus* (Megazyme) y la xilotriosa, incubada a 37°C durante 1 hora, sí muestra un pico identificado como xilosa, en el tiempo de retención adecuado para la columna Sugar Pak I Waters, y según el patrón que se tiene registrado en el programa de análisis de resultados del HPLC, Breeze™ 2 (Figuras 10 a 14). Se sospechaba que al incubar la FE y la FI con la xilotriosa a 37°C durante más tiempo, se alcanzaría una concentración cuantificable de xilosa en el ensayo si existía alguna β -xilosisidasa. Curiosamente, el tampón fosfato potásico en el que se llevó a cabo el ensayo enzimático, provocó la identificación de una señal, con un tiempo de retención muy cercano y solapante al tiempo de retención de la xilotriosa, esto significa que las fracciones. No se encontró un pico correspondiente a la xilosa en ninguno de los ensayos conteniendo las fracciones intracelulares y extracelulares durante las diferentes horas, mientras que el control positivo compuesto por la enzima exo-1,4- β -D-xilosidasa de *B. pumilus* (Megazyme) y la xilotriosa, incubada a 37°C durante 1 hora, sí muestra un pico identificado como xilosa, en el tiempo de retención adecuado para la columna Sugar Pak I Waters, y según el patrón que se tiene registrado en el programa de análisis de resultados del HPLC, Breeze™ 2 (Figuras 10 a 14). Se sospechaba que al incubar la FE y la FI con la xilotriosa a 37°C durante más tiempo, se alcanzaría una concentración cuantificable de xilosa en el ensayo si existía alguna β -xilosisidasa. Curiosamente, el tampón fosfato potásico en el que se llevó a cabo el ensayo enzimático, provocó la identificación de una señal, con un tiempo de retención muy cercano y solapante al tiempo de retención de la xilotriosa, esto significa que para futuros ensayos enzimáticos que vayan a ser analizados con HPLC, utilizando esta misma columna, sería preciso cambiar el tampón y en todo caso realizar una medición en la que solo se halle tampón en la concentración final del ensayo para descartar la aparición de una señal no identificada o utilizar xilobiosa como sustrato para que haya una mejor separación del pico del tampón.

4.3-Purificación y secuenciación del ADN de los clones con actividad β -xilosisidasa en placas con sustrato MUX

Se purificó el ADN de los clones B5-12 y C5-37 y se obtuvo el siguiente rendimiento: 922.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el clon B5-12 y 687.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el clon C5-37. Parte del ADN de

ambos se utilizó para secuenciarlos y se determinó que ambos clones pertenecen a *Acinetobacter johnsonii* con una identidad del 98 %, cuando se compararon las secuencias obtenidas con la base de datos del NCBI, utilizando la herramienta bioinformática Blastn. Ambos clones contienen la región del genoma de *A. johnsonii* comprendida entre los 3,022,339 y 3,055,699 pares de bases. Se sospecha que los demás clones de los pocillos B5 y C5 cuyo resultado fue positivo en placa con sustrato fluorescente MUX podrían contener el mismo genoma, por lo que se decidió trabajar con el clon B5-12 para futuros experimentos.

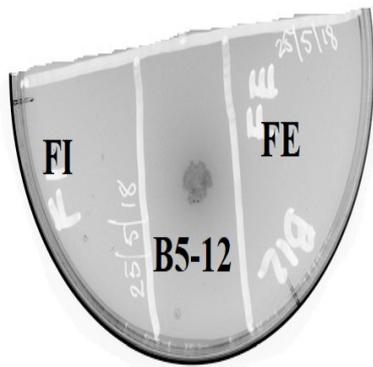


Fig. 7: FE, fracción extracelular. FI, fracción intracelular. Clon B5-12. Actividad β -xilosidasa en sustrato MUX

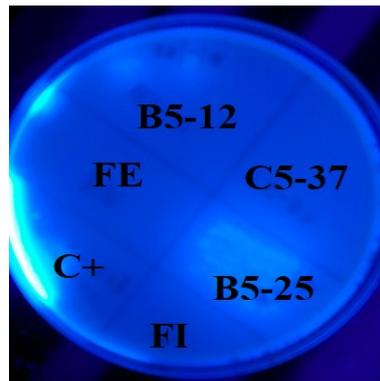


Fig. 8: B5-12, B5-25, C+, control positivo, FE, FI, C5-37. Actividad β -xilosidasa en sustrato MUX.

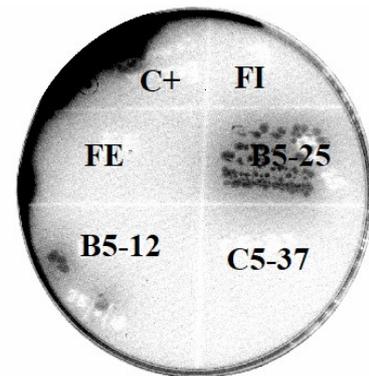


Fig. 9: B5-12; B5-25; FE, fracción extracelular; FI, fracción intracelular; C+, control positivo; C5-37, sin crecimiento. Actividad β -xilosidasa en sustrato MUX

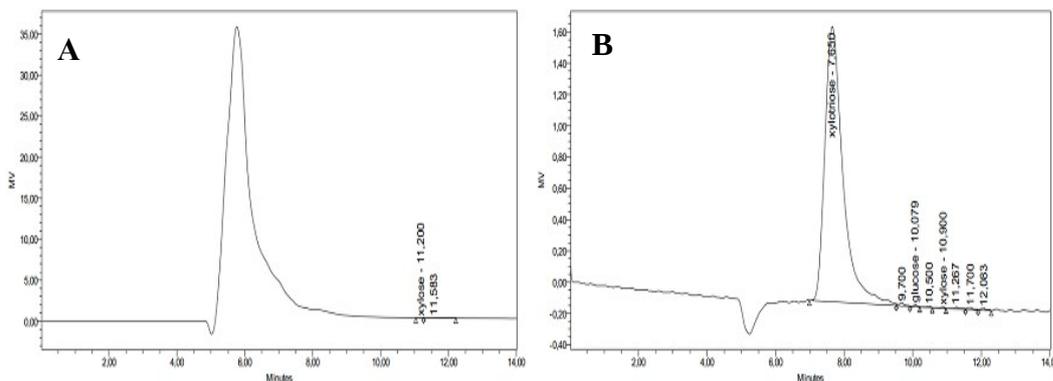


Fig. 10: A, tampón fosfato potásico. B, xilotriosa. Separación por HPLC.

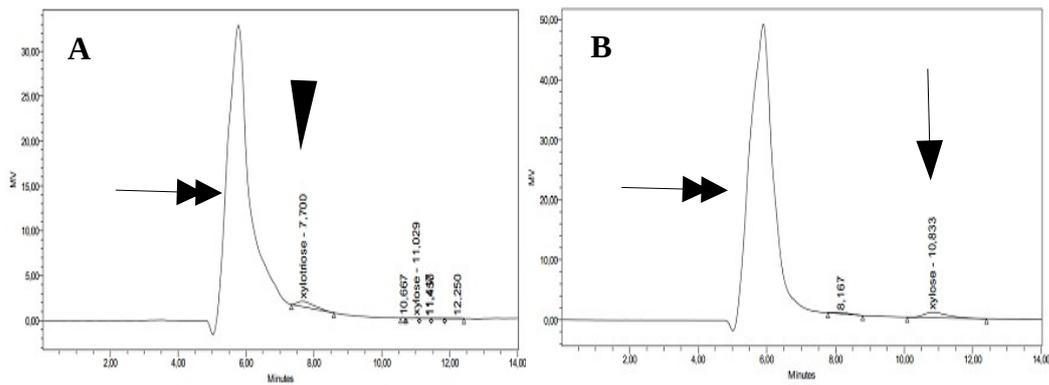


Fig. 11: **A**, control negativo. **B**, control positivo. **Cabeza de flecha**, pico xilotriosa. **Flecha**, pico de xilosa. **Doble flecha**, pico tampón fosfato. Separación por HPLC.

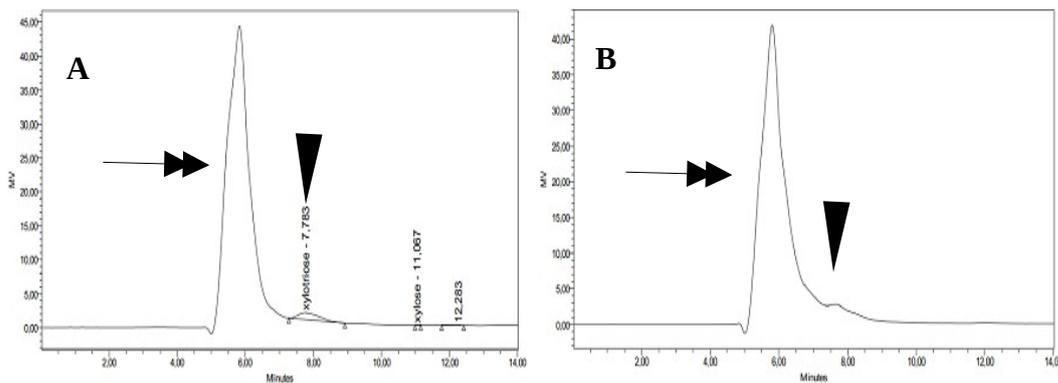


Fig. 12: **A**, FI más xilotriosa a las 24 horas. **B**, FE más xilotriosa a las 24 horas. **Doble flecha**, pico tampón fosfato. **Cabeza de flecha**, pico xilotriosa. Separación por HPLC.

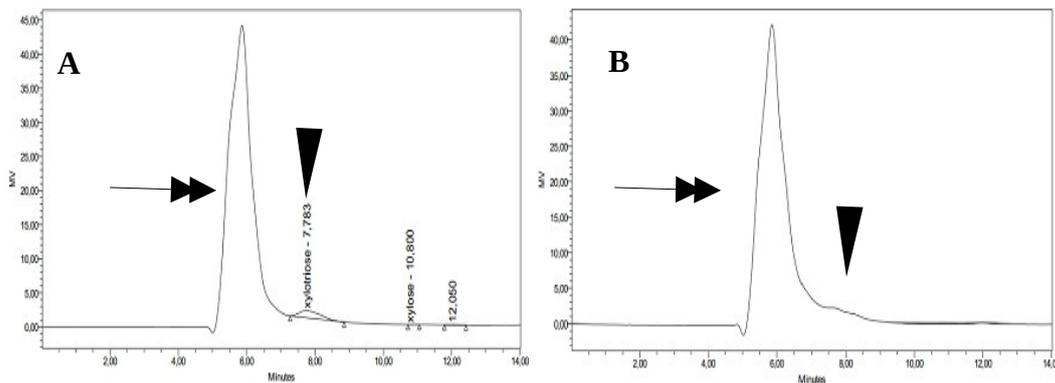


Fig. 13: **A**, FI más xilotriosa a las 48 horas. **B**, FE más xilotriosa a las 48 horas. **Doble flecha**, pico tampón fosfato. **Cabeza de flecha**, pico xilotriosa. Separación por HPLC.

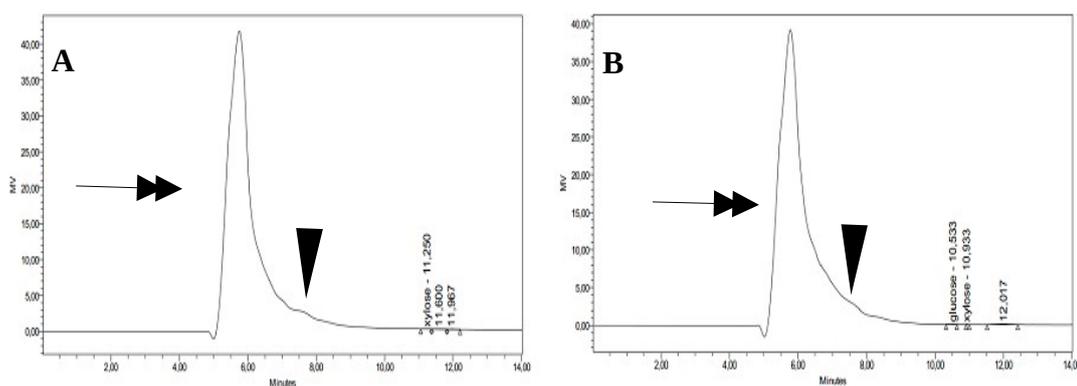


Fig. 14: *A*, FI más xilotriosa a las 72 horas. *B*, FE más xilotriosa a las 72 horas. **Doble flecha**, pico tampón fosfato. **Cabeza de flecha**, pico xilotriosa. Separación por HPLC.

4.3.1-Aislamiento del gen con actividad β -xilosidasa o glucosidasa

Se utilizaron varias enzimas de restricción específica intentando aislar el gen responsable de la enzima que hidroliza el sustrato MUX en placa, debido a que cada una tiene un patrón de corte diferente, resultando en fragmentos de diferentes longitudes y regiones del mismo inserto.

Se realizaron digestiones del ADN del clon B5-12 con diferentes enzimas de restricción específica que cortaran tanto en la región del inserto como en la región del vector pCT3FK y se ligaron los fragmentos en los vectores pJet 1.2 y pSmart, intentando aislar el gen que codifica la enzima que ha mostrado actividad en placa con sustrato MUX. Primero, se realizó una digestión simultánea con las enzimas AatII y NheI, pero no se comprobó el éxito de la digestión cuando se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 0,7 %; se sospecha que la ausencia de bandas en el gel se debió a una baja concentración final de los fragmentos del ADN que ha sido segmentado o una incompatibilidad entre los tampones de ambas enzimas, aunque una reacción se haya hecho en sucesión de la siguiente. Segundo, se realizó una digestión única con la enzima NheI del ADN del clon B5-12 y se decidió ligar los fragmentos en el vector pJet 1.2. Las bacterias transformadas fueron subcultivadas en medio LB con ampicilina y sustrato MUX, donde no se encontró ningún subclón que fuera capaz de hidrolizar el sustrato fluorescente. Tercero, se realizó otra digestión con la enzima HpaI del ADN del clon B5-12, el resultado de la electroforesis fue igual que el primer ensayo, atribuible a la baja concentración de ADN. Cuarto, se realizó otra digestión con las enzimas

Mlu I y Cla I, ambas digestiones de manera separada para evitar la incompatibilidad de tampones. Sin embargo, se presentó el mismo resultado en la electroforesis en gel de agarosa al 0.7 %, ausencia de bandas en los carriles correspondientes. Se le atribuye a la misma causa que las ocasiones anteriores, muy poca cantidad de ADN de cada fragmento como para ser visualizado, así que se decide ligar al vector pJet 1.2 y transformar bacterias *E. coli*, de las cuales solo se obtiene una colonia para cada reacción de transformación. Los nuevos subclones son identificados como B5-12/Mlu I y B5-12/Cla I, se subcultivaron en medio LBA y luego se cultivaron en placas con LBA y sustrato fluorescente MUX, donde ningún subclon mostró actividad β -xilosidasa. Se decidió realizar una reacción en cadena de polimerasas (PCR) con una colonia de cada subclón y comprobar la longitud de los fragmentos introducidos en el vector pJet 1.2. El ADN producto de las PCR se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 0.7 %, pero no se observó ninguna banda. Se sospechó que el vector podría estar mostrando algún defecto y se realizó un control negativo en medio LBA, transformando bacterias *E. coli* con el vector pJet 1.2 vacío, resultando en el crecimiento de varias colonias, por lo que se determinó que el vector estaba demostrando defectos. Quinto, se realizó una última digestión del ADN del clon B5-12 con la enzima de restricción específica, EcoR V; los fragmentos fueron ligados al vector pSmart y se transformaron bacterias *E. coli* que fueron cultivadas en medio LBA, también se realizó un control negativo, transformando bacterias con vectores pSmart vacíos, y un control positivo compuesto por ADN de lambda digerido por la enzima HincII. Se obtuvieron 9 colonias con los fragmentos de ADN digerido con la enzima EcoR V; en el medio LBA con el control negativo crecieron menos de 25 colonias, cumpliendo con los requisitos que especifica el fabricante del vector pSmart; en el medio LBA con el control positivo crecieron más de 25 colonias, también cumpliendo con las especificaciones del fabricante del vector pSmart; cabe resaltar que estos resultados esperados de las transformaciones con el vector pSmart se cumplen cuando se utiliza la cepa *E. coli* 10G de LUCIGEN y que estos resultados varían según la competencia de la cepa de *E. coli* utilizada. Los subclones fueron identificados como B5-12/EcoRV-A, B5-12/EcoRV-B, B5-12/EcoRV-C, B5-12/EcoRV-D, B5-12/EcoRV-E, B5-12/EcoRV-F, B5-12/EcoRV-G, B5-12/EcoRV-H y B5-12/EcoRV-I. Se realizó una PCR (ver 3.3.4 en Métodos) con una colonia de cada subclón y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% con los productos de las amplificaciones; los subclones B5-12/EcoRV-A,

B5-12/EcoRV-B, B5-12/EcoRV-E y B5-12/EcoRV-I contienen insertos de diferentes longitudes (Figura 15).

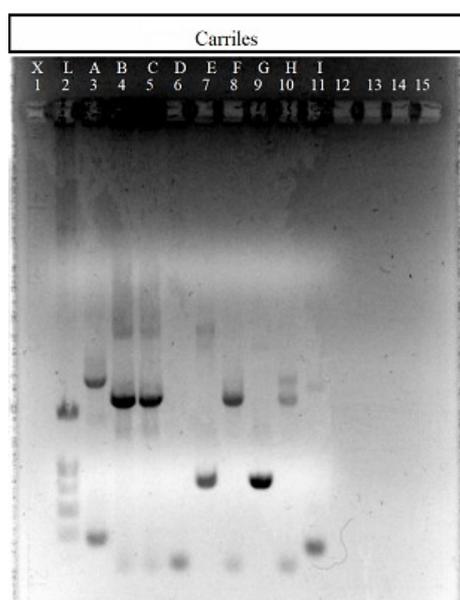


Fig. 15: Carril 2 contiene el GeneRuler 1 Kb DNA Ladder de Thermo Scientific (L). Carriles 4, 5, 8, 10 tienen bandas de peso molecular similar. Carriles 12 al 15 están vacíos.



Fig. 16: A, B5-12/EcoRV-A. B, B5-12/EcoRV-B. E, B5-12/EcoRV-E. I, B5-12/EcoRV-I. Sustrato MUX en LBA.

4.3.2-Purificación y secuenciación de los subclones

Se purificó el ADN de los cuatro subclones que mostraron bandas de diferente longitud en la electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % y se secuenciaron. Se obtuvo una secuencia del cebador Forward y una secuencia del cebador Reverse (ver 3.3.4 en Métodos). El subclón B5-12/EcoRV-A obtuvo una identidad de un 84% para el Forward, correspondiente a la cepa YJ76 plásmido de secuencia no nombrada de *Pantoea ananatis* (ID secuencia: CP022428.1) e identidad de un 98% para el Reverse, correspondiente al vector de clonación pSmart.LCKan (ID secuencia: AF532106.2). El subclón B5-12/EcoRV-B obtuvo una identidad de un 99% para el Forward, correspondiente al vector de expresión pSOSV_FL-vc (ID secuencia: MG880224.1) y una identidad de un 93% para el Reverse, correspondiente al vector de expresión pSmartGC LK (ID secuencia: EU729725.2). El subclón B5-12/EcoRV-E obtuvo una identidad de un 99% para el Reverse, correspondiente al microorganismo *Acinetobacter johnsonii* (ID secuencia: CP010350.1). La secuencia del Forward fue de muy baja calidad para

poder realizar la identificación. El subclón B5-12/EcoRV-I obtuvo una identidad de un 99% para el Forward, correspondiente al microorganismo *E. coli* (ID secuencia: CP029574.1) y una identidad de un 99% para el Reverse, correspondiente al microorganismo *E. coli* (ID secuencia: CP029574.1). Como se puede observar, varios de los fragmentos corresponden a secuencias de vector, como al vector pSmart y a otros vectores como el de *P. ananatis*. Es posible que la construcción del vector pSmart o pCT3FK haya utilizado parte de la secuencia del vector de *P. ananatis* o simplemente sea una secuencia conservada entre vectores, lo mismo se sospecha de la secuencia perteneciente a *E. coli*. Sólo en el subclón B5-12/EcoRV-E fue identificado como *A. johnsonii*, igual que en el clon original.

4.3.3-Identificación del subclón con actividad β -xilosidasa en placa con sustrato MUX

Se subcultivaron los subclones B5-12/EcoRV-A, B5-12/EcoRV-B, B5-12/EcoRV-E, B5-12/EcoRV-I en una placa con medio LBA y sustrato MUX para identificar si alguno presenta actividad β -xilosidasa. No se observó fluorescencia alrededor de ninguno de los subclones (Figura 16). Es posible que ninguno de los subclones contenga el gen necesario para hidrolizar el sustrato, también es posible que sí contenga el gen pero no se encuentre en pauta de lectura para una correcta transcripción, o que se haya insertado sin un promotor, pues el vector pSmart carece de promotor para la expresión del inserto.

4.3.4-Comparación de la hidrólisis del PNPX entre clones positivos en sustrato MUX y β -xilosidasa comercial

Se quiso comparar la capacidad de hidrólisis de los clones B5-12, B5-25 y C5-37 con una unidad enzimática de la enzima exo-1,4- β -D-xilosidasa (MEGAZYME) en 5 mM de PNPX en cultivo bacteriano, debido a que de esta manera la enzima que ha estado hidrolizando el sustrato MUX estaría en mayor concentración y producción activa que si se utilizara solo la fracción intracelular o extracelular, permitiendo conocer si estos clones realmente tienen la capacidad de hidrolizar este sustrato colorimétrico.

El clon C5-37 presentó la mayor capacidad para hidrolizar el sustrato PNPX luego de ser incubado durante 72 horas a 37°C; le siguió el clon B5-12. El clon B5-25, a pesar de haber mostrado la capacidad de hidrolizar el sustrato MUX en el último experimento realizado, no

fue capaz de hacerlo en el sustrato PNPX. Cabe destacar que los clones B5-12 y C5-37 contienen el mismo inserto en las regiones 5' y 3' (Tabla 3, Figura 17).

Tabla 3. Ensayo enzimático colorimétrico con cultivos bacterianos

Clones	B5-12	B5-25	C5-37	Control positivo
Abs 410 nm	(±0.064) 0.136	(±0.077) -0.035	(±0.053) 0.247	3.762

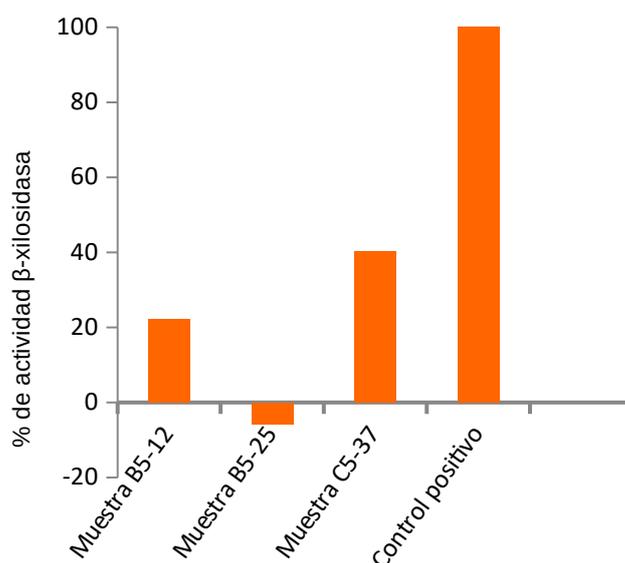


Fig. 17: El clon C5-37 muestra un 40.28 % de actividad al incubarse durante 72 horas en comparación con control positivo (1 U de β -xilosidasa), el clon B5-12 muestra un 22.15 %.

5-Discusión

La frecuencia de aislamiento de clones con actividades de interés a partir de metagenotecas suele ser muy baja, tal es nuestro caso, donde el cribado funcional de enzimas con actividad feruloil esterasa utilizando el sustrato MUCMAC, en 576 colonias de una metagenoteca de aguas termales no mostró candidatos positivos. En la investigación realizada por Sang et al (2011), solo 1 de 50,000 clones de un metagenoma del suelo mostró actividad feruloil esterasa utilizando el mismo sustrato. Además de que las feruloil esterasas son enzimas especializadas y poco frecuentes, se deben considerar las dificultades intrínsecas de expresión que presenta *E. coli* (Gabor et al, 2004).

De dos pocillos de una metagenoteca de las aguas termales de As Burgas, se aislaron 16 clones con la capacidad de hidrolizar el sustrato MUX. Con dos de estos clones, se realizaron ensayos enzimáticos colorimétricos donde no se pudo encontrar la misma actividad β -xilosidasa en el sustrato PNPX con las fracciones intracelulares y extracelulares, tampoco se encontró actividad β -xilosidasa en el ensayo enzimático utilizando estas fracciones con el sustrato xilotriosa (ver 4.2.3 Resultados). Sin embargo, realizando un cultivo líquido en medio LB con PNPX sí se observó la actividad en los dos clones seleccionados que habían mostrado actividad en el sustrato MUX. Pinheiro et al (2015) fueron capaces de detectar microorganismos con actividad β -xilosidasa utilizando el mismo sustrato a partir del intestino del caracol *Achatina fulica*. Zhou et al (2011), aislaron el gen RuBGX1 a partir del metagenoma del rumen de *Bos grunniens*, lo expresaron en *E. coli* y comprobaron su actividad utilizando el sustrato PNPX, también observaron que esta enzima era capaz de hidrolizar el sustrato MUX, y que en presencia de endoxilanasas, liberaba más sacáridos, como la xilotriosa y la xilobiosa, a partir de xilooligosacáridos; demostrando que una enzima β -xilosidasa debería ser capaz de hidrolizar estos sustratos. En nuestro caso, para poder observar la hidrólisis del PNPX, tuvimos que incluirlo como sustrato en un cultivo líquido con los clones positivos durante 72 horas a 37°C, mostrando una actividad inferior a la de 1 U de exo-1,4- β -D-xilosidasa incubada a la misma temperatura por 1 hora. Esto significa que la cantidad de enzima expresada por los clones es inferior a 1 U de enzima, por esto no fue posible detectar la actividad β -xilosidasa en la fracción intracelular o extracelular. Una manera de solventar esta situación sería aislar el gen responsable y clonarlo en un vector de expresión, para obtener más producto génico que el obtenido con el actual vector pCT3FK. Yun-Jung et al (2006) utilizaron esta estrategia para aislar una nueva esterasa a partir de una genoteca del metagenoma del suelo. El gen formaba parte de un inserto de unos 40 Kb dentro del fósido pCC1Fos, por lo que utilizaron enzimas de restricción específica para aislar el gen, subclonándolo en el vector pBluescript SK(+) II, y en el vector pQE30 cuando ya conocían la secuencia exacta del gen. Nosotros intentamos aislar el gen responsable de la actividad β -xilosidasa utilizando una estrategia similar, pero sin éxito (ver 4.3.3 Resultados), a partir de un inserto de unos 30 Kb. El fallo en el éxito pudo deberse al uso de partida de una cantidad muy reducida de ADN para realizar los ensayos de digestión, ligación y transformación, también al uso de vectores que aceptan insertos muy pequeños y que además, uno de ellos

carecía de promotor para expresar el producto; por lo que no logramos acotar la posición del gen.

6-Conclusiones

No se identificaron clones con actividad feruloil esterasa en la genoteca del metagenoma de Muiño Da Veiga ni Río Caldo (Ourense), mediante técnicas de cribado funcional.

Se aisló un clon con actividad β -xilosidasa de la genoteca del metagenoma de As Burgas mediante técnicas de cribado funcional. Se realizaron ensayos de subclonación que deben continuar, para aislar el gen y expresarlo a fin de poder caracterizar esta enzima.

7-Bibliografía

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410

Angelov, A., Mientus, M., Liebl, S., Liebl, W. (2009). A two-host fosmid system for functional screening of (meta)genomic libraries from extreme thermophiles. *Systematic and Applied Microbiology*, 32(3), 177-185. ISSN 0723-2020.

<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.01.003>. Recuperado de

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202009000137?via%3Dihub>

Chan, C.S., Chan, K., Tay, Y.L., Chua, Y.H., Goh, K.M. (2015). Diversity of thermophiles in a Malaysian hot spring determined using 16S rRNA and shotgun metagenome sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 6, 177. DOI:10.3389/fmicb.2015.00177. ISSN:1664-302X.

Recuperado de <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00177>

Collins, J., & Hohn, B. (1978). Cosmids: a type of plasmid gene-cloning vector that is packageable in vitro in bacteriophage lambda heads. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(9), 4242–4246. Recuperado de

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC336088/>

Binnie, C., Cossar, J.D., Stewart, D.I.H. (1997). Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*. *Trends in Biotechnology*, 15(8), 315-320,

ISSN0167-7799, [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01062-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01062-7). Recuperado de

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779997010627>

Daniel, R. (2005). The metagenomics of soil. *Nat. Rev. Microbiol*, 3, 470–478.

<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1160>.

Demain, A.L. & Adrio, J.L. (2008). Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular Biotechnology*, 38(1), 41-55. DOI:10.1007/s12033-007-0035-z. Recuperado de

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12033-007-0035-z>

Eden, P.A., Schmidt, T.M., Blakemore, R.P., & Pace, N.R. (1991). Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 41(2), 324–325. DOI: 10.1099/00207713-41-2-324.

Gabor, E.M., Alkema, W.B.L., Janssen, D.B. (2004). Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. *Environ Microbiol*, 6(9), 879–886.

DOI: 10.1111/j.1462-2920.2004.00640.x. Recuperado de

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1462-2920.2004.00640.x>

- Global Industry Analysts.** Industrial enzymes — a global multi-client market research project. (GIA, San José, California, USA, 2004).
- Gopalan, N., Rodríguez-Duran, L.V., Saucedo-Castaneda, G., Madhavan Nampoothiri, K.** (2015). Review on technological and scientific aspects of feruloyl esterases: A versatile enzyme for biorefining of biomass. *Bioresource Technology*, 193, 534-544. ISSN 0960-8524. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.117>. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415009086>
- Hall, T.A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41, 95-98.
- Handelsman, J.** (2004). Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 669–685. <http://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004>. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC539003/>
- Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A.** (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Tech*, 39(2), 235–51. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016>. Recuperado de http://www.academia.edu/944882/Industrial_applications_of_microbial_lipases
- Hopkins, T.R.** (1991). Physical and Chemical Cell Disruption for the Recovery of Intracellular Proteins. *Bioprocess Technol*, 12, 57-83.
- Hosokawa, M., Hoshino, Y., Nishikawa, Y., Hirose, T., Yoon, DH., Mori, T., ... Takeyama, H.** (2015). Droplet-based microfluidics for high-throughput screening of a metagenomic library for isolation of microbial enzymes. *Biosens Bioelectron*, 67, 379–85. DOI: 10.1016/j.bios.2014.08.059. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566314006551?via%3Dihub>
- Jain, A., Srivastava, P.** (2013). Broad host range plasmids. *FEMS Microbiology Letters*, 348(2), 87–96. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12241>. Recuperado de <https://academic.oup.com/femsle/article/348/2/87/731695>
- Knob, A., Terrasan, C.R.F. & Carmona, E.C.** (2010). β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. *World J Microbiol Biotechnol*, 26(3), 389-407. DOI: 10.1007/s11274-009-0190-4. Recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-009-0190-4#citeas>
- Leveau, J.H.J., Gerards, S., de Boer, W. & van Veen, J.A.** (2004). Phylogeny-function analysis of (meta)genomic libraries: screening for expression of ribosomal RNA genes by

large-insert library fluorescent in situ hybridisation (LIL-FISH). *Environ. Microbiol*, 6(9), 990–998. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2004.00673.x

Lorenz, P., Liebeton, K., Niehaus, F., Eck, J. (2002). Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(6), 572-577. ISSN 0958-1669.

[https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00345-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00345-2).

Meyer, Q.C., Burton, S.G., Cowan, D.A. (2007). Subtractive hybridization magnetic bead capture: a new technique for the recovery of fulllength ORFs from the metagenome.

Biotechnol J, 2(1), 36–40. DOI: 10.1002/biot.200600156. Recuperado de

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/biot.200600156>

Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E., Kubal, M., ... Edwards, R. (2008). The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*, 9, 386.

<http://doi.org/10.1186/1471-2105-9-386>. Recuperado de

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2563014/>

Oliart-Ros, R.M., Manresa-Presas, Á., & Sánchez-Otero, M.G. (2016). Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico.

Ciencia UAT, 11(1), 79-90. Recuperado de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-78582016000200079&lng=es&tlng=es)

[script=sci_arttext&pid=S2007-78582016000200079&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-78582016000200079&lng=es&tlng=es).

Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J., Olsen, & G.J. (1986). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol*, 9, 1–55. Recuperado de https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-0611-6_1

Pinheiro, G.L., Correa, R.F., Cunha, R.S., Cardoso, A.M., Chaia, C., Clementino, M.M., ... Frases, S. (2015). Isolation of aerobic cultivable cellulolytic bacteria from different regions of the gastrointestinal tract of giant land snail *Achatina fulica*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 860. DOI:10.3389/fmicb.2015.00860. Recuperado de

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4542579/>

Preston, A. (2003). *E. coli* plasmid vectors. *Methods in Molecular Biology*. 235, 21–22. ISBN 978-1-58829-151-6. Recuperado de <https://www.springer.com/gb/book/9781588291516>

Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S. F., Grossman, T.H., Liles, M.R., ... Goodman, R.M. (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the

- genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol*, 66(6), 2541–2547. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC110579/>
- Sang, S.L., Li, G., Hu, X.P., Liu, Y.H.**(2011). Molecular Cloning, Overexpression and Characterization of a Novel Feruloyl Esterase from a Soil Metagenomic Library. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 20(4), 196-203. DOI: 10.1159/000329833.
- Schepens, H. et al.** (2003). White Biotechnology: gateway to a more sustainable future. [online] <http://www.europabio.org/sites/default/files/white_biotechnology-_gateway_to_a_more_sustainable_future.pdf>
- Schmeisser, C., Steele, H. & Streit, W.R.** (2007). Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 75(2), 955-962. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0945-5>. Recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-007-0945-5>
- Simon, C., & Daniel, R.** (2009). Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(2), 265–276. <http://doi.org/10.1007/s00253-009-2233-z>. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2773367/>
- Simon, C., & Daniel, R.** (2011). Metagenomic Analyses: Past and Future Trends . *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1153–1161. <http://doi.org/10.1128/AEM.02345-10>. Recuperado de <http://aem.asm.org/content/77/4/1153.abstract>
- Sofijan, H., Shun, T.J., Abbasiliasi, S., Mustafa, S., Puspaningsih, N.T., Kadkhodaei, S. & Ariff, A.B.** (2017) Recovery and partial purification of thermophilic β -xylosidase derived from recombinant *Bacillus megaterium* MS941 by aqueous two-phase system. *Separation Science and Technology*, 52(5), 834-842, DOI: 10.1080/01496395.2016.1268159. Recuperado de <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01496395.2016.1268159>
- Staley, J.T., Konopka, A.** (1985). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol*, 39, 321-346. DOI: 10.1146/annurev.mi.39.100185.001541. Recuperado de <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.mi.39.100185.001541>
- Terpe, K.** (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 72(2), 211-222. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0465-8>. Recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-006-0465-8>

- Tsai, Y.L. & Olson, B.H.** (1992). Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(7), 2292-2295. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC195770/>
- Uchiyama T., Miyazaki, K.** (2009). Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Curr Opin Biotechnol*, 20(6), 616–622. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.09.010>. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166909001244>
- Varriale, S., Cerullo, G., Antonopoulou, I. Christakopoulos, P., Rova, U., Tron, T., ... Faraco, V.** (2018). Evolution of the feruloyl esterase MtFae1a from *Myceliophthora thermophila* towards improved catalysts for antioxidants synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 102(12), 5185-5196. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8995-4>. Recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-018-8995-4>
- Vincze, T., Posfai, J. & Roberts, R.J.** (2003). NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes *Nucleic Acids Res.* 31, 3688-3691
- Wang, G.Y., Graziani, E., Waters, B., Pan, W., Li, X., McDermott, J., ... Davies, J. .** (2000). Novel natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host. *Organic Letters*. 2(16), 2401-2404. DOI: 10.1021/ol005860z. Recuperado de <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ol005860z>
- Wemheuer, B., Taube, R., Akyol, P., Wemheuer, F., & Daniel, R.** (2013). Microbial diversity and biochemical potential encoded by thermal spring metagenomes derived from the Kamchatka Peninsula. *Archaea*, 2013, 136714 . DOI: 10.1155/2013/136714. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3600328/>
- Westers, L., Westers, H., Quax, W. J.** (2004). *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1694(1–3), 299-310, ISSN 0167-4889. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.02.011>. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488904000837>
- Williamson, L.L., Borlee, B.R., Schloss, P.D., Guan, C., Allen, H.K., Handelsman, J.** (2005). Intracellular screen to identify metagenomic clones that induce or inhibit a quorum-sensing biosensor. *Appl. Environ.*

Microbiol, 71(10), 6335–6344. DOI: 10.1128/AEM.71.10.6335-6344.2005. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/16204555/>

Woese, C.R.(1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev*, 51(2), 221–271. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373105/>

Yu, T., Anbarasan, S., Wang, Y., Telli, K., Aslan, A. S., Su, Z., ... Xiong, H. (2016). Hyperthermostable Thermotoga maritima xylanase XYN10B shows high activity at high temperatures in the presence of biomass-dissolving hydrophilic ionic liquids. *Extremophiles*, 20, 515–524. <http://doi.org/10.1007/s00792-016-0841-y>. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4921120/>

Yun-Jung, K, Gi-Sub, C., Seung-Bum, K., Gee-Sun, Y., Yong-Sung, K., Yeon-Woo, R. (2006). Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. *Protein Expression and Purification*, 45(2), 315-323. DOI:10.1016/j.pep.2005.06.008. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592805001956>

Zhou, J., Bao, L., Chang, L., Liu, Z., You, C., Lu, H. (2011). Beta-xylosidase activity of a GH3 glucosidase/xylosidase from yak rumen metagenome promotes the enzymatic degradation of hemicellulosic xylans. *Letters in Applied Microbiology*, 54(2), 79-87. DOI:10.1111/j.1472-765X.2011.03175.x. Recuperado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1472-765X.2011.03175.x>