

Facultad de Ciencias

Grado en Biología

Departamento de Biología

Área de Bioquímica y Biología Molecular

Aislamiento y caracterización de clones con actividad hidrolasa a partir de una metagenoteca de aguas termales

Illamento e caracterización de clons con actividade hidrolasa a partires dunha metaxenoteca de augas termais

Isolation and characterization of clones with hydrolase activity from a metagenomic library of thermal water



Diego Fernández Edreira

Trabajo de Fin de Grado

Fecha de defensa: 18 de septiembre de 2018

Dirigido por la Dra. María Isabel González Siso

FACULTADE DE CIENCIAS**TRABALLO FIN DE GRAO**

La Dra. María Isabel González Siso autoriza la presentación del Trabajo de Fin de Grado “Aislamiento y caracterización de clones con actividad hidrolasa a partir de una metagenoteca de aguas termales” presentado por Diego Fernández Edreira para su defensa ante el tribunal calificador.

En A Coruña, a 10 de septiembre de 2018.

Fdo:

Resumen

Las enzimas termoestables presentan gran importancia debido a las características que les confieren mayor estabilidad y actividad ante condiciones extremas. Por otra banda, las enzimas con actividad lipolítica presentan una gran capacidad y alcance en la industria biotecnológica, pues están siendo usadas en un amplio abanico de industrias, como la alimentaria, la del papel, la de los detergentes, etc. De ahí que suscite gran interés la bioprospección de estas enzimas en metagenotecas procedentes de aguas termales, ya que su gran capacidad de acción en dichas condiciones facilita su posterior uso en la industria. En el trabajo que se expone a continuación, se partió de una metagenoteca de ADN del microbioma de aguas termales procedente de Muíño da Veiga (Ourense) en una cepa de *Escherichia coli* con los objetivos de aislar un clon con actividad lipolítica, caracterizar la enzima obtenida y secuenciar dicho ADN. Partiendo de 9 candidatos iniciales, de los cuales se comprobó previamente su actividad en tributirina, trabajamos con el que menos problemas nos presentaba a la hora de replicar los experimentos aquí descritos. Dicho candidato produjo halo de actividad frente a la tributirina en placas con medio LB, lo que confirmó como positivo en dicha actividad. Posteriormente procedimos a caracterizar nuestra enzima, realizando ensayos de actividad lipolítica en los cuales usamos laurato, octanoato y estearato como sustratos de la reacción. Solo mostró actividad con laurato, con el cual pudimos deducir que presenta un óptimo de actividad a la temperatura de 90°C. Finalmente se realizó la secuenciación del ADN insertado y, a partir de los resultados obtenidos del alineamiento realizado con Blastn, pudimos deducir que se trata de un organismo perteneciente al mismo género que *Conexibacter woesei*, pero no a la misma especie.

Palabras clave: lipasa, esterasa, termoenzima, metagenómica, bioprospección.

Resumo

As enzimas termoestables presentan unha gran importancia debido ás características que lles confiren maior estabilidade e actividade ante condicións extremas. Por outra banda, as enzimas con actividade lipolítica presentan unha gran capacidade e alcance na industria biotecnolóxica, pois úsanse nun amplo abanico de industrias, como a alimentaria, a de papel, a de deterexentes, etc. De aí que suscite gran interese a bioprospección destas enzimas en metaxenotecas procedentes de augas termais, xa que a súa gran capacidade de acción en ditas condicións facilita o seu posterior uso na industria. No traballo que se expón a continuación, partiuse dunha metaxenoteca de ADN do microbioma de augas termais procedente de Muíño da Veiga (Ourense) nunha cepa de *Escherichia coli* cos obxectivos de illar un clon con actividade lipolítica, caracterizar a enzima obtida e secuenciar dito ADN. Partindo de 9 candidatos iniciais, dos que se comprobou previamente a súa actividade en tributirina, traballamos có que menos problemas nos presentaba á hora de replicar os experimentos aquí descritos. Dito candidato mostrou halo de actividade fronte á tributirina nas placas con medio LB, o que confirmou como positivo en dita actividade. Posteriormente procedemos a caracterizar a nosa enzima, realizando ensaios de actividade lipolítica nos que usamos laurato, octanoato e estearato como substratos da reacción. Só presentou actividade co laurato, co cal poidemos deducir que presenta un óptimo de actividade a unha temperatura de 90°C. Finalmente, realizouse a secuenciación do ADN insertado e, a partir dos resultados obtidos no aliñamento realizado co Blastn, poidemos deducir que se trata dun organismo pertencente ao mesmo xénero que *Conexibacter woesei*, pero non á mesma especie.

Palabras crave: lipasa, esterasa, termoenzima, metaxenómica, bioprospección.

Summary

Thermostable enzymes show an enormous importance due to the characteristics, that confer them more stability and also more activity against extreme conditions. Moreover, the enzymes with lipolytic activity have a high capacity and reach in the biotechnological industry, being used in a wide range of industries, such as the food-processing industry, the paper industry, the detergent industry and so on. Hence, it arises interest the bioprospecting of these enzymes in metagenomics libraries from thermal waters, since their great capacity of action in these conditions makes easier their later use in the industry. In this assignment, which is going to be exposed above, we departed from a metagenomics library of DNA from the microbiome of thermal waters from Muíño da Veiga (Ourense) transformed into a strain of *Escherichia coli*. Starting from 9 initial candidates, whose activity on tributyrin was previously checked, we worked with the one that gave us the least problems to replicate the experiments that are described here. This candidate produced an halo of activity against tributyrin in plaques with LB medium, which finally confirmed its positive activity. Later, we proceeded in order to characterize our enzyme, performing lipolytic activity assays. In this assays we used laurate, octanoate and estearate as substrates. It only showed activity on laurate with which we could deduce that it shows an optimum of activity at the temperature of 90°C (194°F).

Finally, we performed the inserted DNA sequencing and, regarding to the results that we obtained from the alignment done with Blastn, we could deduce that it is an organism belonging to the same gender that *Conexibacter woesei* but a different species.

Keywords: lipase, esterase, termoenzyme, metagenomics, bioprospecting.

Índice

1. Introducción	6
1.1. Lipasas y esterases.....	6
1.2. Metagenómica.....	7
1.3. Termófilos.....	8
2. Objetivos	9
3. Material y métodos	10
3.1. Manipulación del ADN	10
3.2. Medios de Cultivo	10
3.3. Aislamiento y Preparación de Extractos.....	11
3.4. Cuantificación proteica	12
3.5. Ensayos de actividad lipolítica	12
3.6. Electroforesis en gel de acrilamida	13
3.7. Extracción del ADN	13
3.8. Secuenciación	14
4. Resultados	15
4.1. Aislamiento de clones positivos para actividad lipolítica en placa	15
4.2. Ensayos de actividad lipolítica	17
4.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida	23
4.4. Secuenciación	24
5. Discusión	27
6. Conclusiones	28
6.b. Conclusiones	28
6.c. Conclusions	28
7. Bibliografía	29
8. Anexo 1: Abreviaturas	31

1. Introducción

La bioprospección de enzimas en organismos microbianos se debe a que suelen ser más útiles que las obtenidas a partir de animales o plantas, debido a la gran variedad de reacciones que estas enzimas pueden llevar a cabo y el gran potencial que tienen, así como a la facilidad de manipulación genética y la gran rapidez de crecimiento de los microorganismos productores, a un bajo coste. Además, en su gran mayoría, las enzimas microbianas son más estables que sus homólogas vegetales o animales. Alrededor del 2% de los microorganismos del mundo han sido testados como fuentes de enzimas ¹.

1.1. Lipasas y esterasas

Las lipasas (EC 3.1.1.3) son enzimas, de la familia de las alfa/beta hidrolasas, que catalizan la hidrólisis, y también la síntesis, de ésteres formados por glicerol y ácidos grasos de cadena larga. En condiciones acuosas producen glicerol, ácidos grasos, monoglicéridos y diglicéridos; sin embargo, en condiciones de baja actividad de agua actúan produciendo glicéridos (Figura 1). Las lipasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, ya que están presentes tanto en microorganismos como en animales y plantas. Las principales razones del enorme potencial que tienen las lipasas microbianas son que permanecen estables en solventes orgánicos, no requieren la presencia de cofactores, presentan amplia especificidad de sustrato y tienen una alta enantioselectividad ^{2,3}.

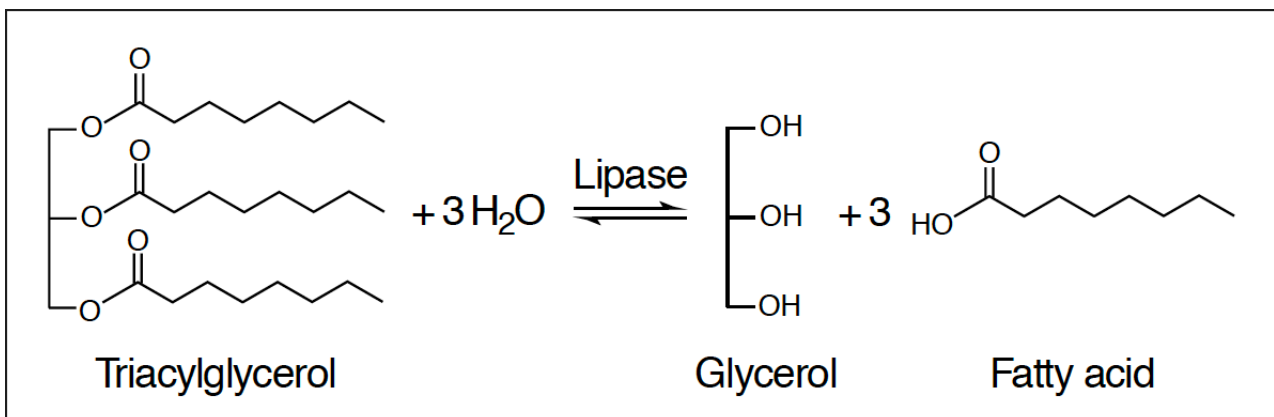


Figura 1. Acción catalítica de las lipasas ².

Debido a este alto potencial, las lipasas son usadas en un rango muy amplio de industrias, siendo la más importante la de detergentes, por su capacidad de hidrolizar grasas, sirviendo de aditivos tanto en detergentes domésticos como en industriales. Las lipasas usadas en este ámbito deben tener una baja especificidad de sustrato, es decir, poder actuar a lo largo de un amplio espectro de grasas, poder mantener su actividad y viabilidad en condiciones de lavado (alto pH y temperaturas moderadamente altas), y por último, la capacidad de resistir tensioactivos y enzimas perjudiciales como las proteasas (las cuales suelen ser ingredientes de muchos detergentes) ⁴.

También son muy utilizadas en la industria alimentaria, por ejemplo los ésteres producidos a través de lipasas se pueden utilizar como componentes de aromas o sabores, en la industria láctea y confitería se usan para hidrolizar la grasa de la leche y obtener los productos con sabores específicos ⁵.

Uno de los usos más conocidos es el que desempeña junto a celulasas y ligninasas, en la industria del papel, a la hora de eliminar los componentes hidrofóbicos ⁵.

Existe otro segundo grupo de enzimas de bastante interés dentro de la familia de las alfa/beta hidrolasas, denominadas esterases (EC 3.1.1.1), las cuales se diferencian de las lipasas por sus características bioquímicas. Una de las diferencias principales es que tienen diferentes preferencias por sustratos. Las esterases hidrolizan solamente ésteres de ácidos grasos solubles en agua, de cadena corta (menos de 10 átomos de carbono) mientras que las lipasas muestran preferencia por los ésteres de ácidos grasos poco solubles en agua, de cadena larga (más de/o 10 átomos de carbono). Además, las esterases presentan un comportamiento cinético clásico de *Michaelis-Menten*, mientras que la mayoría de las lipasas sufren un fenómeno llamado "*interfacial activation*". Dicho fenómeno deriva de que las lipasas presentan una tapa que protege el centro activo de la enzima, cuya apertura desencadena la activación repentina de esta ^{6,7}.

1.2. Metagenómica

Se estima que alrededor del 99% de los microorganismos presentes en la naturaleza no se pueden cultivar con facilidad, por ende, no están accesibles para su uso o investigación. De hecho, muchas especies en la mayoría de los ambientes nunca han sido descritas por esta razón. Para dejar atrás esta situación, se han ido desarrollando distintos métodos moleculares basados en el ADN, por lo general basados en los genes que codifican el ARNr 16s, ya que estos métodos dan una amplia información sobre los taxones y especies que se hayan en un ambiente determinado. Por desgracia, suelen proporcionar muy poca o ninguna información del papel funcional que desempeñan los microorganismos en una comunidad. Sin embargo, la metagenómica es un campo cuyo objetivo es analizar los genomas complejos de nichos microbianos, prescindiendo de la fase de cultivo ^{8,9}.

Los estudios metagenómicos (Figura 2) se inician con el aislamiento del ADN ambiental, obteniendo así una mezcla de material genético de los distintos organismos de la comunidad, a continuación se clona el ADN en un vector adecuado (plásmidos, cósmidos, fósidos o BACs), luego se introduce por transformación en una cepa de una bacteria adecuada para ser hospedadora, y por último se lleva a cabo el análisis de cribado, ya sea por secuenciación o por una actividad determinada (análisis funcional) ⁸.

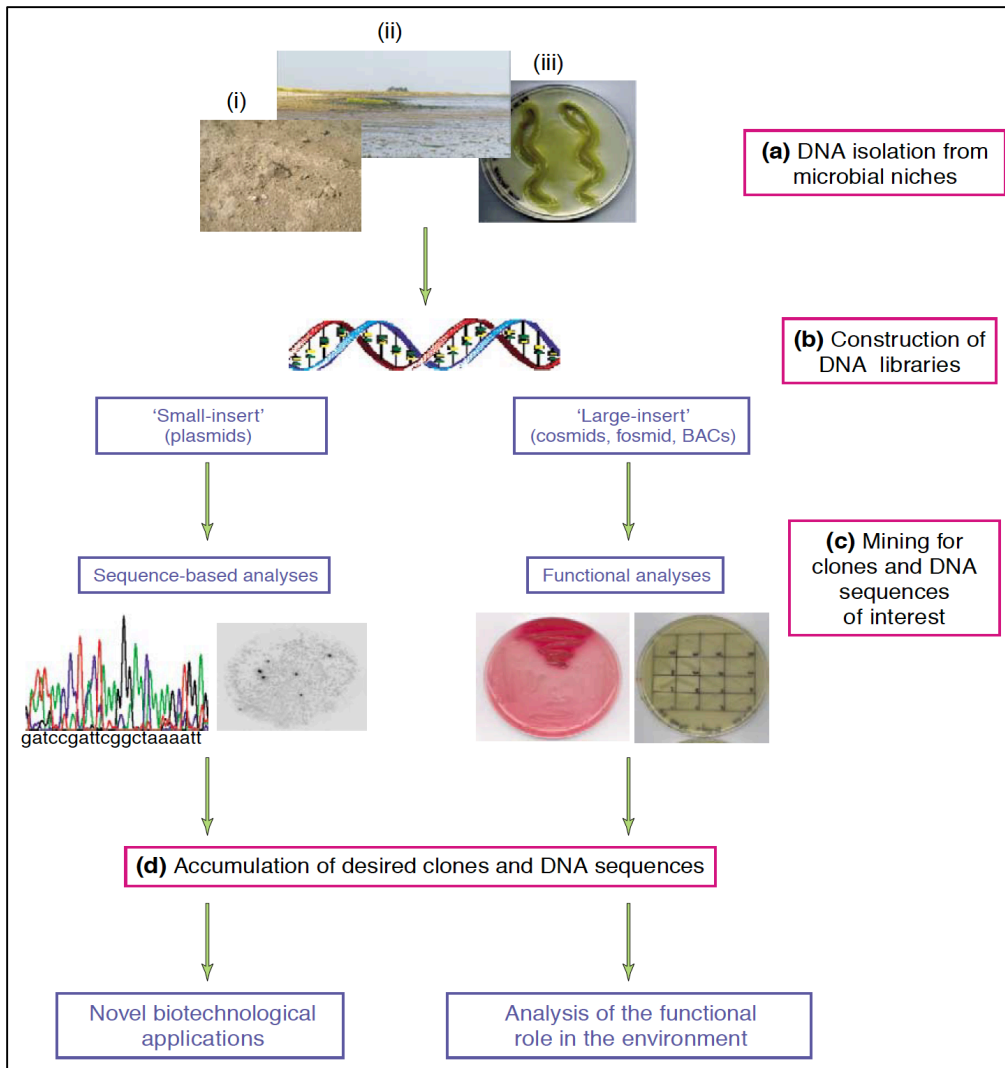


Figura 2. Etapas de la metagenómica ⁸.

1.3. Termófilos

Los organismos termófilos son aquellos que pueden vivir en condiciones de temperatura extrema, por encima de los 50°C, los cuales pueden ser hallados en zonas geotérmicas, compost y ambientes creados por el hombre. Además, estas altas temperaturas suelen ir acompañadas de situaciones extremas de pH o anoxia. La adaptación de estos organismos, debido a su gran flexibilidad metabólica dada por sus enzimas, llamadas termoenzimas, los convierten en objetivo de muchas industrias y estudios biotecnológicos. El crecimiento de organismos termófilos en condiciones de laboratorio es un paso limitante para su estudio y utilización ¹⁰.

2. Objetivos

1. Aislamiento de un clon con actividad lipolítica a partir de una metagenoteca de aguas termales
2. Caracterización de la enzima obtenida
3. Secuenciación del ADN

3. Material y métodos

3.1. Manipulación del ADN

El material de partida de este trabajo fue una metagenoteca de aguas termales procedente de Muíño da Veiga (Ourense), la cual estaba disponible en el laboratorio de Bioquímica de la UDC. Esta fuente termal tiene una temperatura de surgencia de 68°C y un pH de 7.

En resumen, para la construcción de la metagenoteca se recolectaron 125 L de agua y se filtraron empleando filtros de 0.22 μm para retener el material celular. Se siguió el procedimiento detallado en el kit comercial *Metagenomic DNA Extraction Kit For Water* (Epicentre Biotechnologies) para extraer el material genético presente en la muestra. La metagenoteca se construyó a partir de dicho material empleando el kit comercial *CopyControl fosmid library production kit* (Epicentre Biotechnologies), como hospedador la cepa de *E. coli* Epi300T1^R y como vector el fósido pCT3FK¹¹.

3.2. Medios de Cultivo

El medio de cultivo líquido (Figura 3) utilizado con la cepa de *E. coli* transformada fue LB (Luria-Bertani)¹². La composición usada, para 1 L, fue: 10 g de bacto triptona, 5 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura, disueltos en agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121 °C y 2 Bar de presión durante 40 min. A posteriori, en este cultivo líquido se usó como agente selectivo el cloranfenicol para el plásmido pCT3FK, a una concentración final de 12.5 $\mu\text{g/mL}$, partiendo de un stock de 33 $\mu\text{g/mL}$ (378,8 $\mu\text{L/L}$ de medio). También se añadió arabinosa al 10% como agente inductor del vector (2 mL/L de medio).

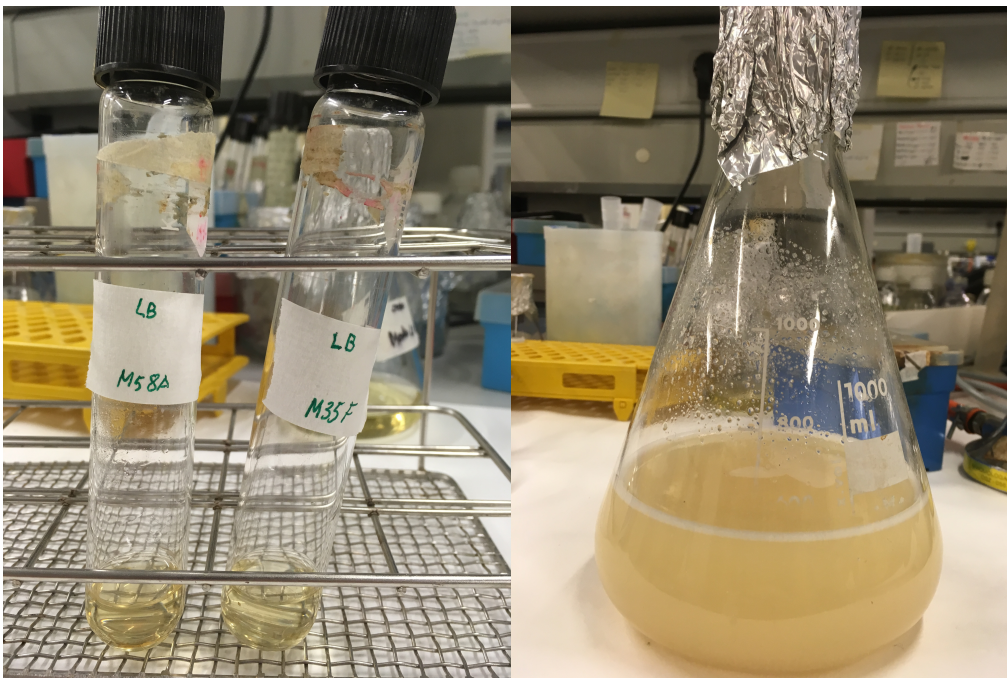


Figura 3. Medio LB líquido y sólido.

El medio sólido (Figura 3) utilizado con la cepa de *E. coli* transformada fue el siguiente: 5 g/L de bacto peptona, 3 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de goma arábica, 10 mL de tributirina al 1% y 13 g/L de bactoagar. Todo ello disuelto en agua destilada. Se esterilizó a 121°C y 2 Bar de presión durante 40 min. También se usó como agente selectivo el cloranfenicol y, como inductor arabinosa, a las mismas concentraciones finales que en el medio líquido.

3.3. Aislamiento y Preparación de Extractos

En la determinación de la actividad lipolítica se partió de una placa de 96 pocillos con un subgrupo de clones con actividad en tributirina. Se realizó una primera placa de medio sólido LB con 9 candidatos elegidos por su actividad en tributirina y cuyo nombre se corresponde con: la inicial de la fuente termal de donde se obtuvo el ADN, en este caso la M de Muíño, el número de placa en la que se depositó en un primer momento y, finalmente su posición en la placa de 96 pocillos, donde se agruparon los ADN más interesantes, de la cual partimos en este trabajo (M58A, M22C, M13D, M58E, M53F, M35F, M31G, M22H, M57H). Para ello, usamos un asa de siembra la cual introdujimos en los pocillos correspondientes a estos candidatos, cogiendo un poco de muestra, se frotó el asa en la placa de medio sólido inicial (Figura 6). De esta placa se seleccionó para seguir con el experimento las muestras correspondientes a los pocillos M35F y M58A, pero finalmente nos quedamos solamente con la M35F, ya que fue esta la que nos dió más facilidades para replicar el experimento y mejores resultados.

Para el aislamiento (Figura 4) se repicó la colonia de la placa inicial y se llevó a 10 mL de cultivo líquido LB, se dejó en agitación y en estufa a 37°C durante 24 h. Pasado este tiempo se midió la densidad óptica (DO) a 600 nm, alcanzando un valor medio de 2.7, a continuación se realizaron diluciones seriadas, sembrando 100 µL de las diluciones 10^{-7} y 10^{-8} , ya que en las anteriores a éstas había mucha acumulación de colonias, en placas de medio sólido LB usando esferas de vidrio, se dejaron en estufa durante 24-48 h aproximadamente hasta ver los halos de actividad positiva en tributirina. Posteriormente, con un asa de siembra, se repicó una colonia positiva en dicha actividad, lo más aislada posible del resto de las colonias, y se sembró en 10 mL de cultivo LB nuevamente, volviendo a empezar este proceso, a esto lo llamamos pase. Paralelamente este proceso también se realizó con *E. coli* sin transformar (control).

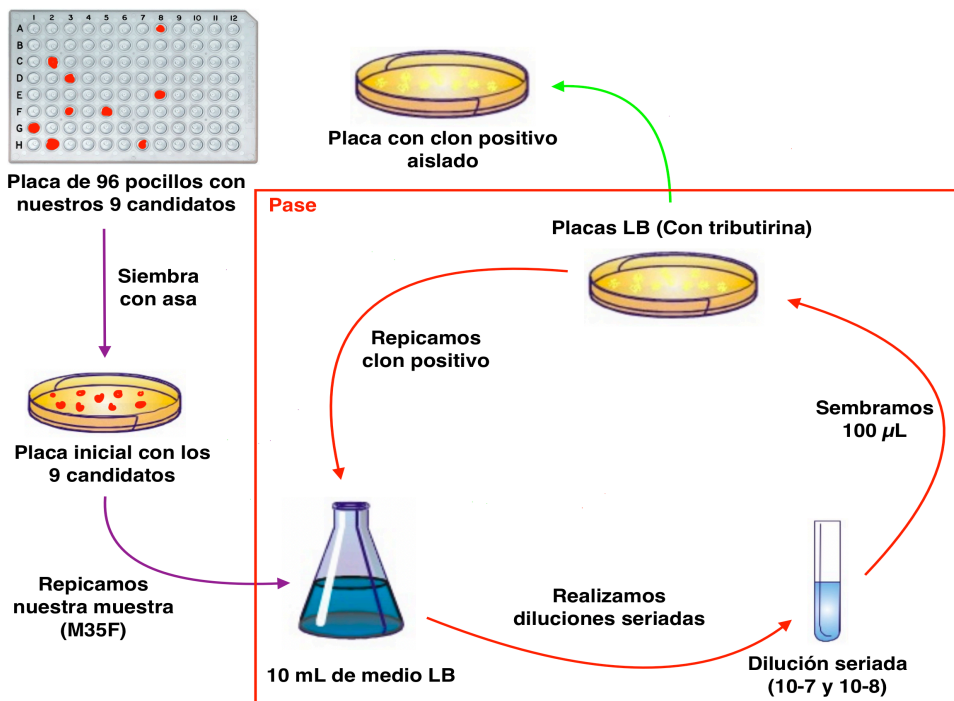


Figura 4. Proceso de aislamiento y purificación de nuestra muestra.

Hicimos 5 pases con nuestra muestra M35F y denominamos al clon aislado 1, el cual se obtuvo el 18/10/17; posteriormente llegamos a la conclusión de que aún no estaba totalmente aislada y realizamos otros 5 pases más para asegurarnos de que estaba totalmente aislada, lo denominamos aislado 2, el cual se obtuvo el 18/04/18.

Para la extracción de las fases intracelular y extracelular se partió de 10 mL de ambos cultivos, es decir, tanto de nuestra muestra M35F como de *E. coli* sin transformar, se pasaron a tubos Falcon, y se centrifugaron en una centrifuga refrigerada a 4°C y 5000 rpm durante 10 min, se recogió el sobrenadante, ya que conforma la fracción extracelular, y se resuspendió el pellet en 4 mL de tampón TRIS (Tris 50 mM, EDTA 25 mM y NaCl 25 mM, pH 8). A continuación, se llevó al sonicador, la muestra estuvo siempre en hielo durante su acción. El programa utilizado fue el siguiente: una amplitud del 100%, pulsos de 2 segundos, pausas de 8 segundos y durante 5 min de acción de ultrasonidos. Posteriormente, se centrifugó de nuevo, bajo las mismas condiciones, quedándonos esta vez con la fracción sobrenadante, que es el extracto intracelular, pudiendo ser guardado a -20°C.

Las características de los medios líquidos y sólidos LB utilizados son los explicados en el apartado anterior, tanto para nuestra muestra como para *E. coli* sin transformar.

3.4. Cuantificación proteica

En la cuantificación de proteínas se usó el método de Bradford ¹³. Para ello se tomaron 10 µL de muestra que fueron mezclados con 200 µL del reactivo *Protein-assay* de *Bio-Rad* (dilución 1:5), se homogenizó todo en un vórtex y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Al pasar dicho tiempo se leyó la absorbancia empleando como blanco un mismo preparado, pero sustituyendo la muestra por agua destilada. Los datos se interpolaron en una recta patrón hecha con albúmina de suero bovino (BSA), en un rango de concentraciones que iban de 0 mg/mL a 0.50 mg/mL. La absorbancia a la que se hicieron las lecturas fue de 595 nm.

3.5. Ensayos de actividad lipolítica

En primer lugar usamos el protocolo descrito en el artículo de Fuciños *et al* ¹⁴, con adaptaciones a nuestro laboratorio. Este fue el que se utilizó para el aislado 1.

Debido a que con el primer aislado, y en múltiples ensayos, no obtuvimos datos concluyentes, decidimos cambiar el protocolo con el aislado 2, y se utilizó una adaptación del protocolo del artículo de Lee *et al* ¹⁵. Se mezclaron 210 µL de tampón de reacción (50 mM TrisHCl pH 8.2, 0.3 % tritón X-100, 1 mM CaCl₂), 20 µL de solución de sustrato (1 mM de paranitrofenil-ésteres disueltos en isopropanol), 20 µL de nuestra muestra (o del control) y, tras la incubación, 50 µL del tampón de parada (100 mM Na₂CO₃).

Los sustratos utilizados fueron paranitrofenil-ésteres del estearato, laurato y octanoato, los cuales cuando se hidrolizan cambian la pigmentación del medio a un tono amarillo por liberación del p-nitrofenol unido. El rango de temperatura de incubación abarcó desde los 30°C hasta los 95°C. Se utilizaron como controles agua destilada y extracto de *E. coli*. Tanto de la muestra como de *E. coli* se analizaron los extractos intra y extracelulares.

Los ensayos se llevaron a cabo de la siguiente manera: se incubaron durante 5 min el tampón de reacción y el sustrato; a continuación, se les añadió la muestra, dejando que se produzca la reacción durante 40 min. Al pasar este tiempo se le añadió el tampón de parada y se dejó reposar en hielo durante 15 min. A posteriori se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 min y finalmente se leyó la absorbancia a 400, 410 y 420 nm en un espectrofotómetro, usando una placa de 96 pocillos cargados con 200 µL de muestra (Figura 5).

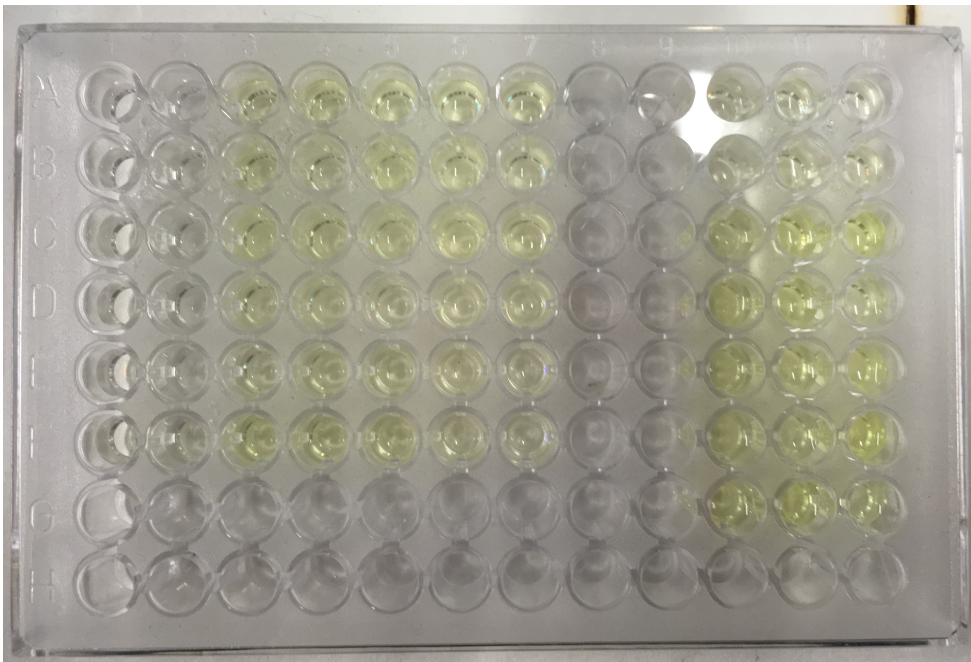


Figura 5. Placa de 96 pocillos utilizada para leer nuestros datos.

Para el primer aislado se realizó también una desnaturalización térmica diferencial, tratamiento para comparar el efecto del calor entre la actividad de la cepa de *E. coli* transformada y la de *E. coli* control. Este tratamiento térmico se basó en incubar la muestra y *E. coli* (Control) a 70°C durante 15 min.

3.6. Electroforesis en gel de acrilamida

La separación proteica por electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE):

-Gel de acrilamida (10%): bis-Acrilamida (29%) 3.33 mL, 1.5 M Tris pH 8.8 2.5 mL, H₂O destilada 4 mL, SDS (10%) 100 µL, APS (10%) 50 µL y TEMED 20 µL.

-Tampón de carga: SDS (10%) 400 µL, Glicerol 200 µL, Tris-HCl 1 M pH 6.8 120 µL, Azul de Bromofenol (0.1%) 20 µL, H₂O destilada 160 µL y β-mercaptoetanol 100 µL.

-Solución de tinción: Azul de Comassie 25 mg, Ác. acético 10 mL y H₂O destilada 90 mL.

-Solución de destinción: Ác. acético 10 mL y H₂O destilada 90 mL.

Las cantidades cargadas fueron: 14 µL de muestra, 3 µL de tampón de carga y 5 µL de marcador. Como marcador se utilizó *NzyColour Protein marker II* (*Nzy Tech*), y se dejó correr durante 2 h con un voltaje de 150 V. Se observó en un cañón *Molecular imager® Gel Doc™XR+(Bio Rad)* usando el software *Image Lab™ Software*.

Se les aplicó un tratamiento térmico a los extractos de la cepa de *E. coli* (Control) y nuestra muestra antes de cargarlos en el gel. Este tratamiento térmico se basó en incubar la muestra y *E. coli* (Control) a 70°C durante 15 min.

3.7. Extracción del ADN

Para la extracción del ADN se utilizó el protocolo *FosmidMAX™ DNA Purification Kit* (*Epicentre Biotechnologies*) variando el paso 17, en el que el tampón TE se sustituyó por agua destilada para que no interfiriera, el EDTA que éste contiene, con la posterior secuenciación.

3.8. Secuenciación

La secuenciación fue llevada a cabo por la Unidad de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidade da Coruña. Se utilizaron los siguientes *primers*:

KOF (*primer* secuenciación *forward* pCT3FK): CGACGGCCAGTGCCAAGCTTGC.

T7 (*primer* secuenciación *reverse* pCT3FK): TAATACGACTCACTATAGGG.

Una vez obtenida la secuencia se utilizó el programa BioEdit, que es un editor de alineación de secuencias biológicas, para seleccionar (por interpretación) el principio y el final de nuestra secuencia a utilizar, es decir, para obtener una secuencia más fiable. El criterio utilizado fue: no tomar bases de antes de la posición 30 ni tampoco a partir de la posición 800.

En este trabajo se utilizó el programa informático BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), para el alineamiento de las secuencias. Está alojado en el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

En primer lugar, se utilizó Blastn para buscar y comparar nuestra secuencia de ADN con otras secuencias que ya han sido caracterizadas con anterioridad.

En segundo lugar, se utilizó el BlastX para traducir la secuencia (en las tres posibles pautas de lectura por hebra) y comparar nuestra secuencia de aminoácidos con las existentes en las bases de datos.

Y, por último, se utilizó la base de datos UniProt, para observar todas las proteínas descritas de la especie que más similitud presentó con nuestra secuencia.

4. Resultados

4.1. Aislamiento de clones positivos para actividad lipolítica en placa

El resultado positivo, en actividad hidrolasa, se da si alrededor de la colonia aparece un halo transparente, debido a la degradación de la tributirina.

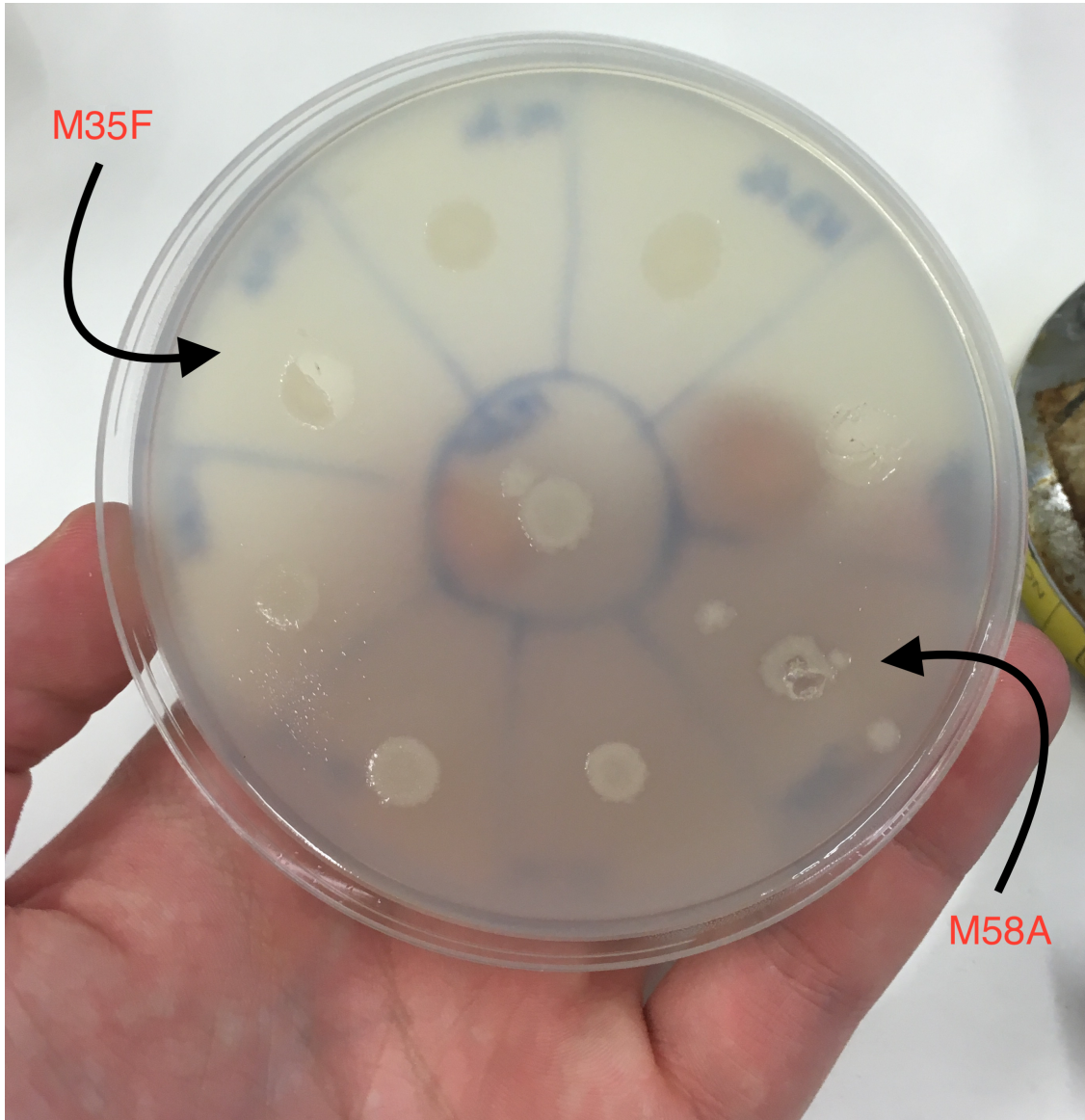


Figura 6. Placa con los 9 candidatos potenciales.

En la placa inicial (Figura 6), en la cual se sembraron 9 candidatos elegidos por su posible actividad positiva en tributirina, detectada previamente, y cuyos nombres se corresponden con su posición en la placa de 96 pocillos de la que provienen, la cual es resultado de la construcción de la metagenoteca según en el punto 3.1., podemos observar que los más llamativos son el candidato M35F y el M58A. Escogimos para trabajar el candidato M35F, ya que mostraba halos de actividad antes que el candidato M58A, con el cual no proseguimos debido a que tardaba mucho en producirse el halo de actividad.

Nuestra muestra (M35F) se aisló siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3., realizando 5 pases para el aislado 1 (Figura 7) y el doble para el aislado 2 (Figura 8), debido a que del primero no se obtuvo una colonia totalmente aislada.

Finalmente, en el aislado 2 pudimos ver claramente que nuestra muestra estaba totalmente aislada, ya que por mucho que hiciéramos más pases no observábamos ninguna colonia sin halo de actividad con tributirina.

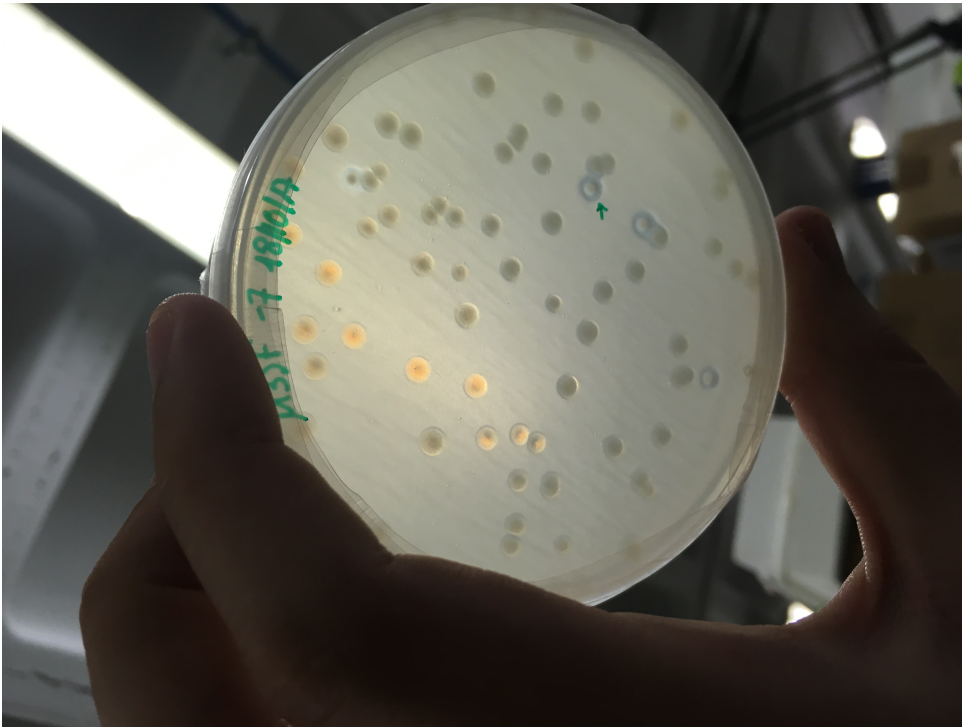


Figura 7. Placa con halos de actividad correspondientes al primer aislamiento realizado (18/02/17).

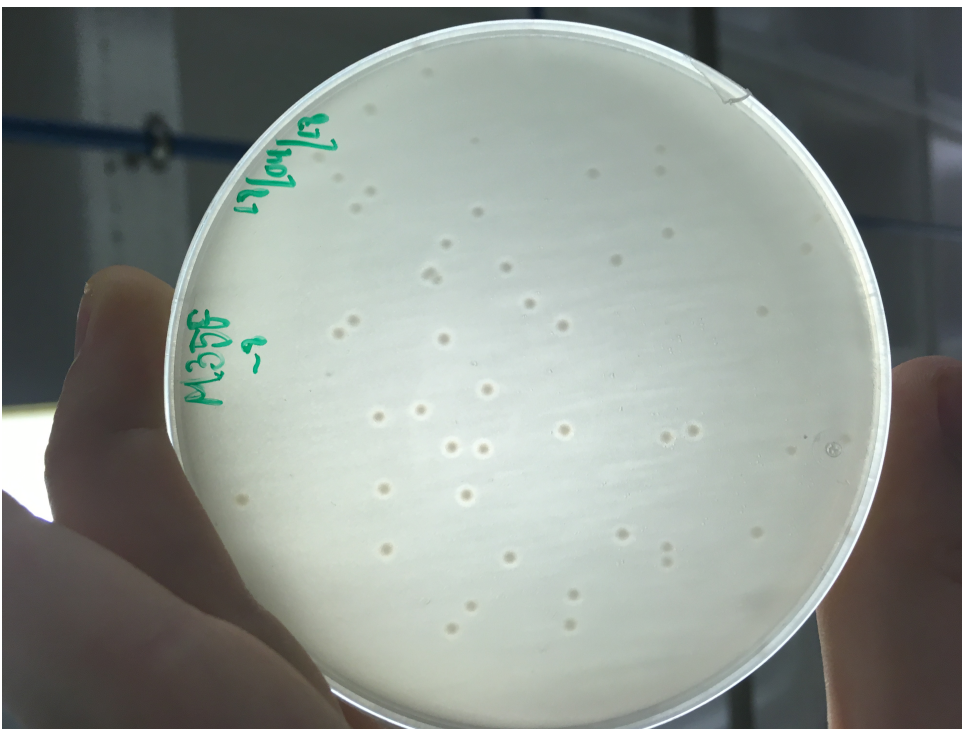


Figura 8. Placa con halos de actividad correspondientes al segundo aislamiento realizado (18/04/18).

4.2. Ensayos de actividad lipolítica

1. Resultados para el aislado 1 (Figura 7):

En estos ensayos se utilizó el primer protocolo¹⁴ y sólo laurato (pNP-Laurato) como sustrato.

-Localización subcelular de la actividad:

Este primer ensayo (Tablas 1 y 2, Figura 9) se llevó a cabo para averiguar dónde estaba la actividad lipolítica, si en la fracción extracelular o en la fracción intracelular de nuestra muestra. Se realizó un ensayo ajustando el primer protocolo a 25 μ L y 40 min, y otro con el protocolo normal. Como podemos observar presenta mayor actividad la fracción intracelular, de ahí que los siguientes ensayos se hayan realizado con dicha fracción de la muestra. Se ve una desviación estándar acusada ya que los valores de absorbancia son muy pequeños.

Tabla 1. Actividad lipolítica: Abs 420 nm (25 μ L, 40 min, 50°C).

Blanco	0.088	0.097	0.086
Fracción extracelular	0.156	0.149	0.099
Fracción intracelular	0.198	0.107	0.1

Tabla 2. Actividad lipolítica: Abs 420 nm (100 μ L, 20 min, 50°C).

Blanco	0.123	0.12	0.113
Fracción extracelular	0.161	0.19	0.169
Fracción intracelular	0.3	0.208	0.335

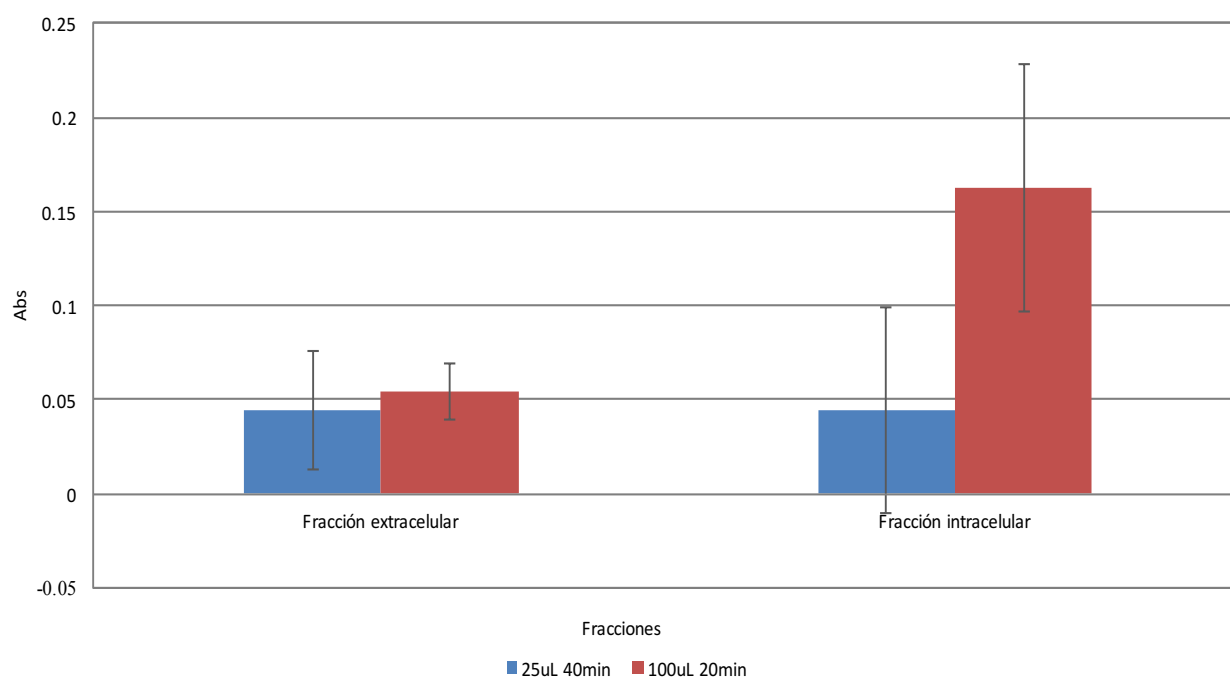


Figura 9. Comparación de ambos ensayos (Tablas 1 y 2).

-Influencia de la temperatura en la actividad:

En este ensayo (Tabla 3 y Figura 10) se determinó la actividad de nuestra muestra a diferentes temperaturas, y cómo difería de la actividad de una muestra de *E. coli* control. Se puede observar que los valores de nuestra muestra a las temperaturas más altas (90-95°C) presentan una tendencia ascendente, mientras que los pertenecientes a *E. coli* presentan una tendencia descendente a partir de los 90°C, aun así, las diferencias no son significativas. La alta desviación estándar a altas temperaturas es debido a que las altas temperaturas pueden evaporar algo de líquido y variar el resultado.

Tabla 3. Actividad lipolítica: Abs 420 nm (100 µL, 40 min, 30-95°C).

°C	Blanco	Blanco	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	Muestra	Muestra	Muestra
30	0.09	0.25	0.222	0.225	0.279	0.265	0.25
40	0.175	0.124	0.269	0.178	0.372	0.304	0.237
50	0.198	0.129	0.351	0.308	0.323	0.399	0.325
60	0.113	0.113	0.418	0.48	0.326	0.482	0.566
70	0.118	0.233	0.345	0.506	0.449	0.474	0.38
80	0.161	0.276	0.59	0.554	0.56	0.411	0.38
85	0.292	0.377	0.689	0.887	0.777	0.74	0.725
90	0.297	0.353	0.921	0.928	0.748	0.572	1.017
95	0.193	0.336	1.112	0.492	0.914	1.343	0.619

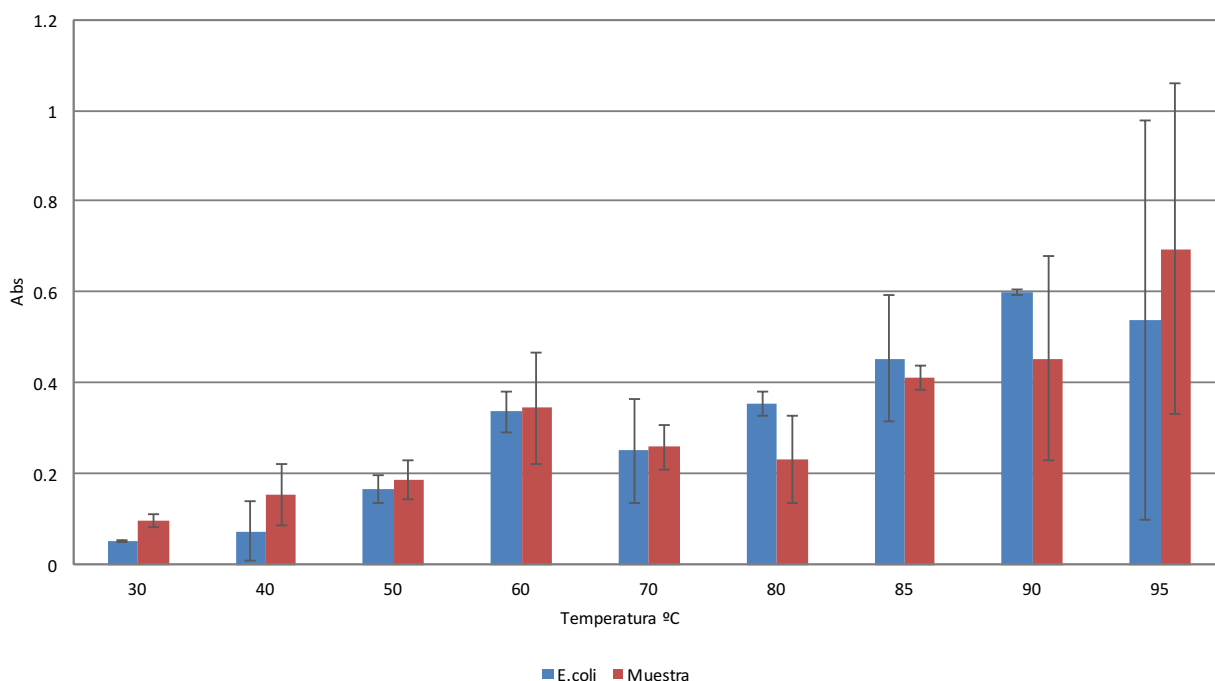


Figura 10. Actividad lipolítica: Abs 420 nm (100 µL, 20 min. 30-95°C). (Se muestran las medias de las Abs, una vez restada la media del blanco).

-Desnaturalización térmica diferencial:

En este ensayo (Tabla 4 y Figura 11) se aplicó un tratamiento térmico previo, descrito en Materiales y Métodos (apartado 3.5), con el fin de comprobar como diferían las actividades debido a la desnaturalización diferencial de las proteínas según su origen termófilo o no. Se puede observar que no hay diferencias significativas entre la actividad de nuestra muestra y la de *E. coli* control, con o sin tratamiento térmico. También se observa que el tratamiento térmico hace disminuir los valores de actividad enzimática, debido probablemente a la desnaturalización de enzimas nativas de *E. coli*. Sin embargo al aumentar la temperatura de incubación en los ensayos con tratamiento térmico previo, se puede observar una tendencia ascendente para nuestra muestra y una descendente para *E. coli* sin transformar, lo que se explica por el origen termófilo de nuestra enzima. La alta desviación estándar, puede deberse a la evaporación de medio debido a las altas temperaturas, así como a los bajos valores de absorbancia sobre todo en el caso de las muestras sometidas a tratamiento térmico.

Tabla 4. Actividad lipolítica: Abs 420 nm (100 μ L, 40 min, 40-50-60°C) TT= tratamiento térmico previo.

°C	Blanco	Blanco	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> TT	<i>E. coli</i> TT	<i>E. coli</i> TT
40	0.119	0.107	0.364	0.198	0.184	0.131	0.134	0.297
50	0.098	0.126	0.315	0.249	0.242	0.168	0.094	0.19
60	0.155	0.117	0.405	0.31	0.472	0.188	0.224	0.119
	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra TT	Muestra TT	Muestra TT		
40	0.205	0.198	0.205	0.136	0.109	0.129		
50	0.284	0.256	0.248	0.093	0.195	0.098		
60	0.518	0.352	0.35	0.153	0.193	0.169		

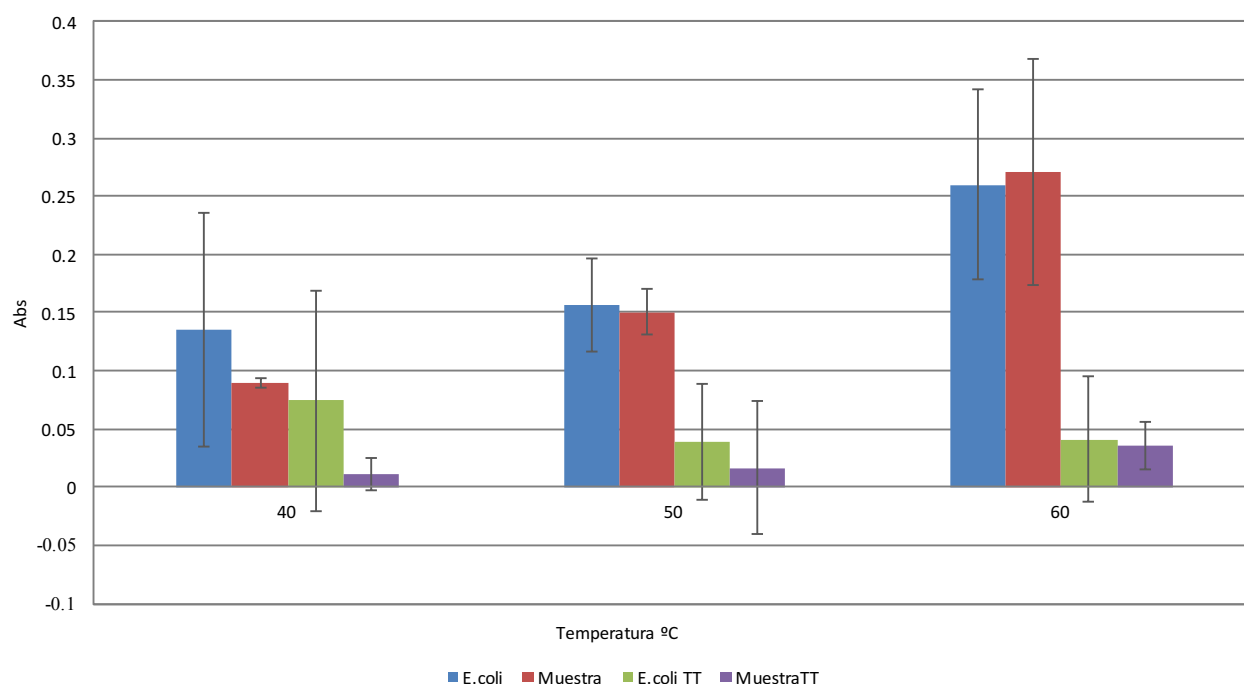


Figura 11. Actividad lipolítica: Abs 420 nm (100 μ L, 40 min, 40-50-60°C). TT= tratamiento térmico previo. (Se muestran las medias de las Abs, una vez restada la media del blanco).

2. Resultados para el aislado 2 (Figura 8):

-Actividad con el sustrato estearato (pNP-estearato):

En este ensayo (Tabla 5) se quiso comprobar si nuestra muestra tenía actividad lipolítica con un sustrato de cadena larga (18 C). Se puede observar que los valores de actividad de nuestra muestra son similares a los de *E. coli* sin transformar.

Tabla 5. Actividad lipolítica: Abs 410 nm (20 μ L, 40 min, 30 y 50°C).

°C	Blanco	Blanco	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	Muestra	Muestra	Muestra
30	0.175	0.14	0.134	0.197	0.117	0.177	0.134
50	0.163	0.218	0.128	0.13	0.185	0.208	0.168

-Actividad con el sustrato octanoato (pNP-octanoato):

En este ensayo (Tabla 6 y Figura 12) se quiso comprobar si nuestra muestra tenía actividad lipolítica con un sustrato de cadena corta (8 C). Se puede observar que los valores que nuestra muestra presenta son similares a los de *E. coli* sin transformar.

Tabla 6. Actividad lipolítica: Abs 410 nm (20 μ L, 40 min, 40-90°C).

°C	Blanco	Blanco	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	Muestra	Muestra	Muestra
40	0.166	0.177	0.476	0.402	0.477	0.394	0.412	0.496
50	0.267	0.187	0.47	0.424	0.444	0.44	0.411	0.558
60	0.239	0.274	0.422	0.473	0.398	0.582	0.435	0.421
70	0.237	0.234	0.476	0.475	0.666	0.531	0.529	0.529
80	0.3	0.338	0.445	0.512	0.583	0.454	0.471	0.509
90	0.418	0.497	0.683	0.61	0.69	0.533	0.687	0.572

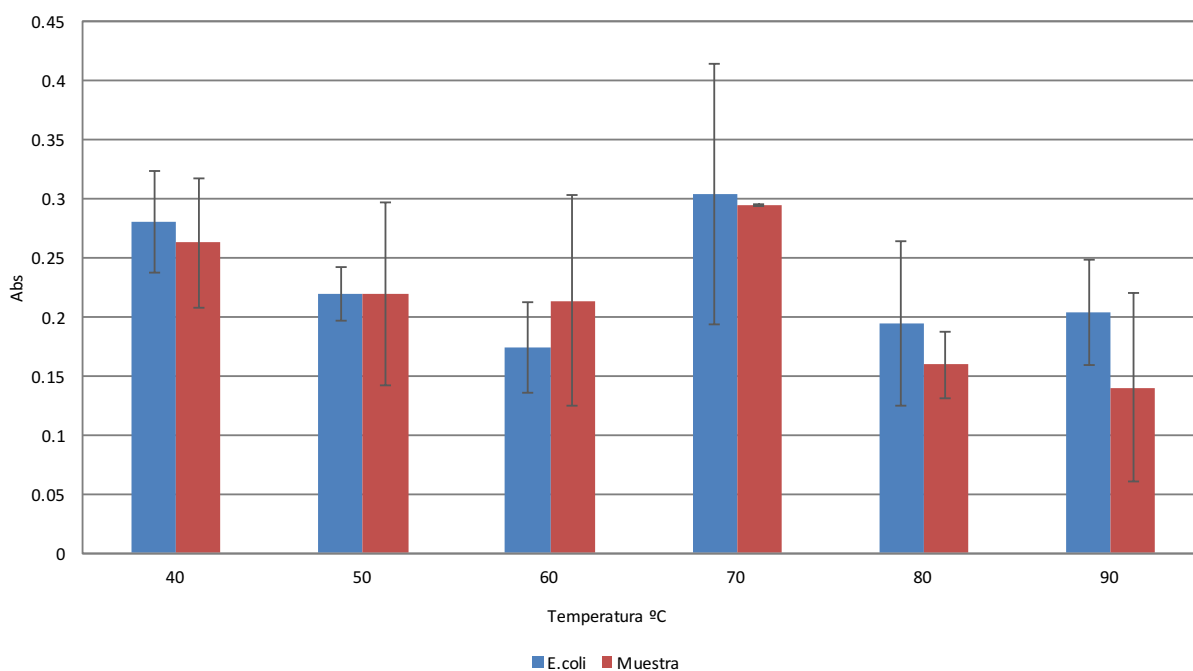


Figura 12. Actividad lipolítica: Abs 410 nm (20 µL, 40 min, 40-90°C). (Se muestran las medias de las Abs, una vez restada la media del blanco).

-Actividad con el sustrato laurato (pNP-Laurato):

En este ensayo (Tabla 7 y Figuras 13,14 y 15) se quiso comprobar si nuestra muestra tenía actividad lipolítica con un sustrato de cadena intermedia (12 C). Se puede observar una gran diferencia entre los valores de nuestra muestra y *E. coli* sin transformar, nuestra muestra presenta una tendencia ascendente con el aumento de la temperatura mientras que la tendencia de *E. coli* sin transformar es ascendente hasta los 70-80°C y a partir de ahí descendiente. La alta desviación estándar a altas temperaturas es debido a que las altas temperaturas pueden evaporar algo de líquido. A partir de la actividad absoluta y la concentración de proteína, obtenida mediante el método de Bradford, podemos estimar la actividad específica de la muestra (Figura 14), en la que podemos observar que la actividad de nuestra muestra aumenta con la temperatura pudiendo presentar un óptimo a los 90 °C, o incluso a una mayor temperatura que no fue medida en este ensayo. Por tanto, el pNP-Laurato constituye un sustrato adecuado para la medida de la actividad lipolítica con la enzima aislada de la metagenoteca, que muestra mucha menor actividad sobre sustratos de cadena más larga o más corta.

Tabla 7. Actividad lipolítica: Abs 410 nm (20 µL, 40 min, 40-90°C).

°C	Blanco	Blanco	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	Muestra	Muestra	Muestra
40	0.102	0.105	0.148	0.141	0.131	0.228	0.244	0.242
50	0.09	0.124	0.138	0.126	0.136	0.267	0.293	0.242
60	0.1	0.097	0.148	0.122	0.133	0.264	0.278	0.314
70	0.103	0.115	0.164	0.151	0.186	0.318	0.359	0.369
80	0.171	0.147	0.212	0.234	0.227	0.413	0.504	0.406
90	0.193	0.194	0.25	0.245	0.245	0.632	0.793	0.581

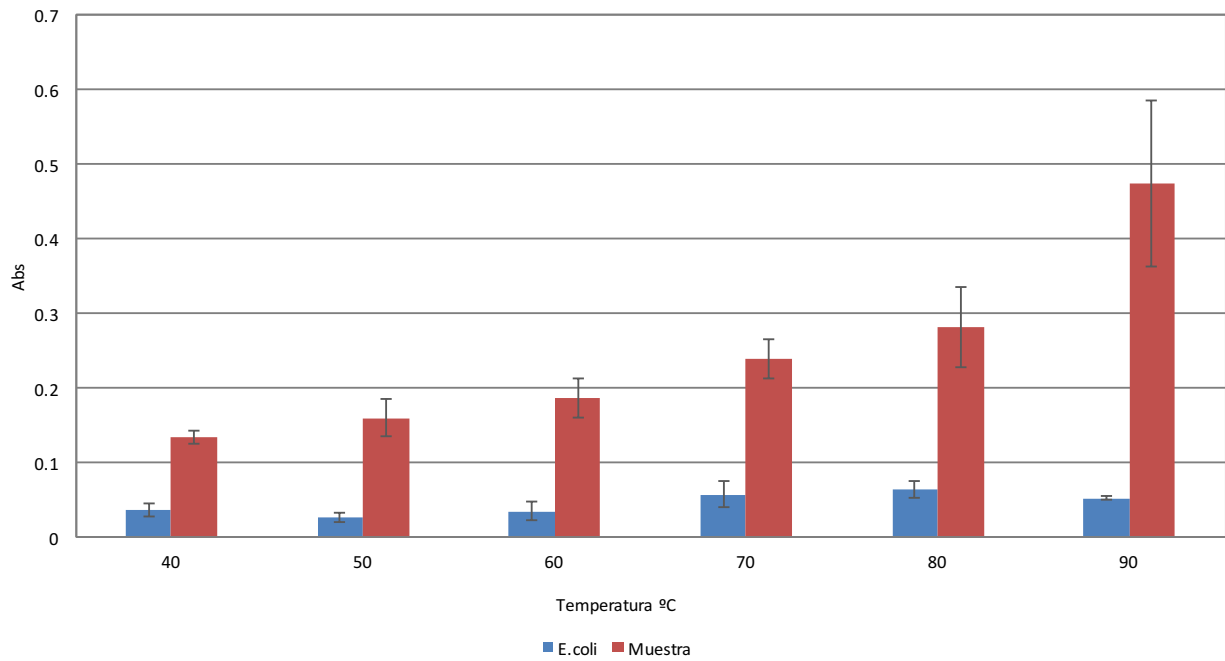


Figura 13. Actividad lipolítica: Abs 410 nm (20 μ L, 40 min, 40-90°C). (Se muestran las medias de las Abs, una vez restada la media del blanco).

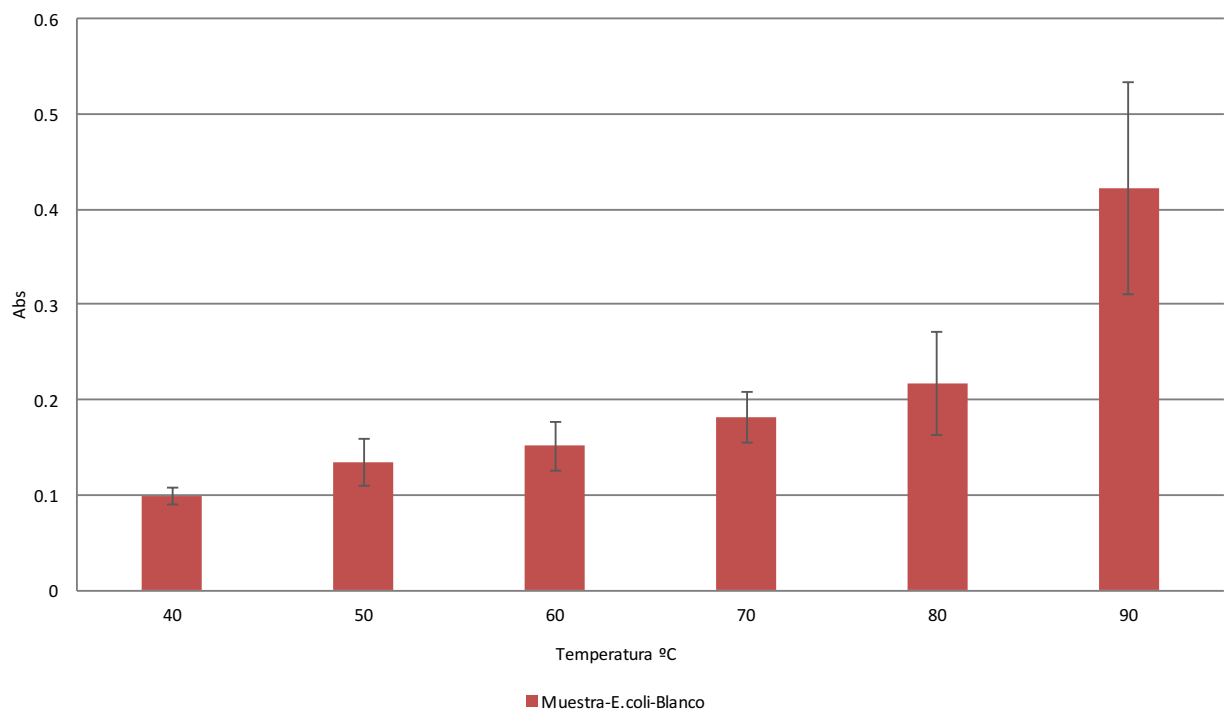


Figura 14. Actividad lipolítica: Abs 410 nm (20 μ L, 40 min, 40-90°C). (A la muestra se le resto tanto el blanco como la actividad de E. coli).

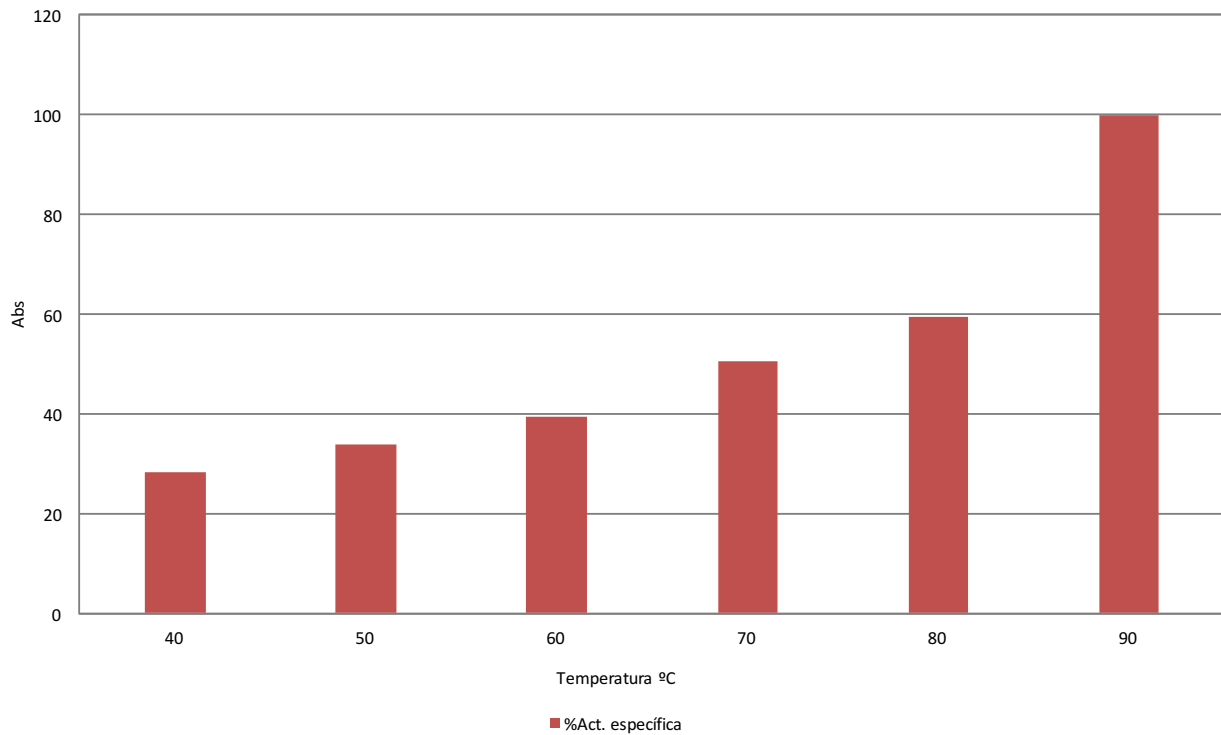


Figura 15. Act. Específica: Abs 410 nm (20 μ L, 40 min, 40-90°C).

4.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida

En este gel (Figura 16) no se aprecian diferencias entre los carriles de *E. coli* sin transformar y nuestra muestra sin realizar tratamiento térmico, sin embargo, se pueden observar tres bandas diferentes en la muestra tratada térmicamente, una de 180 Kda, otra de 72 Kda y otra de 25 Kda, que podrían corresponder a la enzima producida por el clon aislado de la metagenoteca.

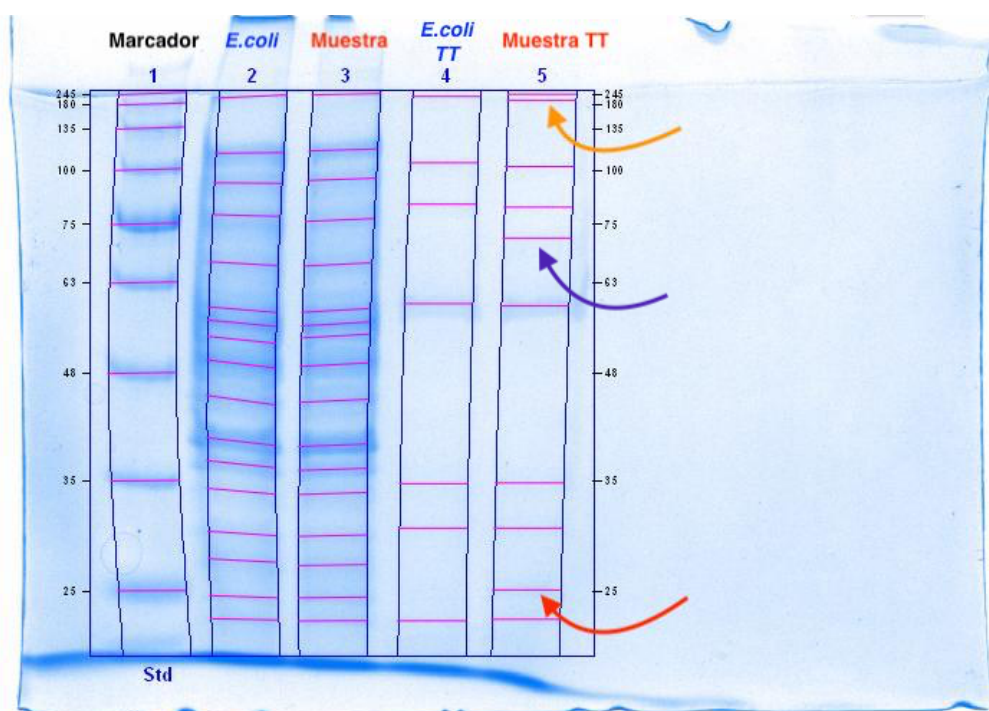


Figura 16. Gel de SDS-PAGE (Las líneas lilas son añadidas por el software automáticamente si detecta banda de muestra).

4.4. Secuenciación

La secuencia obtenida con el *primer forward* (KOF) del pCT3FK fue:

CGCGCTGTCGACACCCGCGTCATGACCGCCTCGACTGGCACACTTGCGCACCTGCG
CGCACAGGTGGGATGTCCATGGTCTTCCCGCTCGTTGCGGGCGCTTTCGGGGCATGT
CCACACCTCCACACCCCCTACAACCTCTCTCTATCTCGTCCAGGAGACCATCGTGAA
GCTGCAGACCTCCAGCTCCGACCTCCTCGCCCAGCTCGGAGCCGCCGCCCGCGTC
GCCTCCACGCGCAGCGCGGTCCAGGCGCTGTCCGGGGTCCAGGTCTGTGACCGCGG
ACGGTTCGCGCCGAGCTGCGGGGCGACCGACATGGAGGTTGGGCTCAAGGTGCCGCT
GCCGGCCACCGTTCGAGCGCGCCGGCTCGGTCTGTGTTGCCGGCCCGGCTGCTCCTC
GACGTGCCCCGCGTCTTGCCCGCCTCCGACGTGTGCTCGAGCATCGTCCGTCCGA
GGGCGACGTTCGAGATCGTGTGCGGGGAGCGCGCGCTACCACGTGCGCACGCTGCGA
GGGAGGACTTCCACCGTTTCCCGAACCGGGGCGACGCCGCGGTCTGCCGCCTCC
CGGCGGGCGCCTTTCGTCGAGACGGTTCGCAAGGTTCGAGCGCTCAGCGTCGAAGGA
TGAGACGCGGCCGATCCTCACCGGCATCCTCGTGTGCGGCCGCCGGCAGTGAGCTGA
AGATGGTCGCGACGGACTCCTACCGTCTCTCGGTGAAGGAGACGAAGCTGGACGCG
GCGATCGACGGCGAGTTCGAGGGCCAACGT

La secuencia obtenida con el *primer reverse* (T7) del pCT3FK fue:

TGGGCACCGGCGGCATGTCGACGGTGTACCGCGCGTTTCGACACGGTCCTCGAGCGT
CAGGTTCGCGATCAAGCTCATGCATCGCGACGTGCCCCGGCACACCGACCAGCTCGA
GCGCTTCCGGCGGGAGGCGCGGGCCGTGCGCACAGCTCAACCACCCGCACATCGTG
CAGGTTCATCGACTTCGGCGAGGACCGCAGCACGCCGTACATCGTGCTCGAGTACGT
CGACGGCGAGACGCTGAAGGACCGCATCCGCCGGCTCGGCCGCCTGCCGATCCCC
GAGGCCGTCGCCTACGCGATCGAGATCGGCCGCGCGCTGCAGGCCGCGCACGAGC
GCAGCATCGTGCACCGCGACGTCAAGCCGCAGAACGTGCTCGTCGACGAGGAGGG
CTCGGCGAAGGTGACGGACTTCGGCATCGCGCGCACCCCTCGACCAGGAGGGACTG
ACCGCGGACGGCCGCGTCTTGGGCACCACCGACTACGTCTCCCCCGAGCAGGCGC
TCGGCCAGCCGGTACCGGGCAGAGCGACGTGTACTCGCTCGGCGTGGTGTGTTT
GAGATGCTCACCGGCGACGTCCCGTTCAAGGGCGACAACCAGGTGGCAGTCGCGAT
GAAGCACGTGCGCGAGGAGCTGCCCGACGTGACGCTTCGCCGCCCGGAGGTCTCC
GCCGCGCTGGCCGCCGTGCTCGACCGCGCGACGGAGAAAGGACCTCGACGCCCGC
TATCCGAGCGCCGGCGCGTTCATCGCCGACCTCGAAGACGCGCTCGCGATCGA

La secuencia reversa del *primer reverse* (T7 R.C.) del pCT3FK fue:

TCGATCGCGAGCGCGTCTTCGAGGTCGGCGATGAACGCGCCGGCGCTCGGATAGC
GGGCGTCGAGGTCCTTCTCCGTGCGCGGTCGAGCACGGCCGGCCAGCGCGGGCGG
AGACCTCCGGGCGGGCAAGCTGCACGTGGGCGAGCTCCTCGCGCACGTGCTTCATC
GCGACTGCCACCTGGTTGTGCGCCCTTGAACGGGACGTGCGCCGGTGCAGCATCTCGAA
CAGCACCACGCCGAGCGAGTACACGTGCTCTGCCCGGTGACCGGCTGGCCGAGC
GCCTGCTCGGGGGAGACGTAGTCGGTGGTGCCAGGACGCGGCCGTCCGCGGTCA
GTCCCTCCTGGTTCGAGGGTTCGCGCGGATGCCGAAGTCCGTACCTTCGCCGAGCCC
TCCTCGTCGACGAGCACGTTCTGCGGCTTGACGTGCGGGTGCACGATGCTGCGCTC
GTGCGCGGCTGCAGCGCGCGGCGGATCTCGATCGCGTAGGCGACGGCCTCGGGG
ATCGGCAGGCGGCCGAGCCGGCGGATGCGGTCTTCAGCGTCTCGCCGTGACGCT
ACTCGAGCACGATGTACGGCGTGTGCGGTCTCGCCGAAGTCGATGACCTGCACG
ATGTGCGGGTGGTTGAGCTGTGCGACGGCCCGCGCCTCCCGCCGGAAGCGCTCGA
GCTGGTTCGGTGTGCCGGGCGACGTGCGGATGCATGAGCTTGATCGCGACCTGACGC
TCGAGGACCGTGTGCAACGCGCGGTACACCGTCGACATGCCGCCGGTGCCCA

1. Resultado del alineamiento realizado con el Blastn:

-Usando la secuencia obtenida con KOF:

Tabla 8. Primer resultado obtenido al hacer el alineamiento con el primer forward.

Descripción	Puntuación máxima	Puntuación total	Query cover	E value	Identidad	Nº de acceso	Query	Sbjct
<i>Conexibacter woesei</i> DSM 14684, complete genome	31	420	78%	2E-86	73%	CP001854.1	160-752	1565-2156

-Usando la secuencia obtenida con T7

Tabla 9. Primer resultado obtenido al hacer el alineamiento con el primer reverse.

Descripción	Puntuación máxima	Puntuación total	Query cover	E value	Identidad	Nº de acceso	Query	Sbjct
<i>Conexibacter woesei</i> DSM 14684, complete genome	713	1501	99%	0.0	81%	CP001854.1	1-711	23193-23962

Usando ambas secuencias obtenidas tanto con el *primer forward* KOF como con el *primer reverse* T7 los alineamientos tuvieron como mejor resultado secuencias del genoma de *Conexibacter woesei* (Tablas 8 y 9), el cual está completamente secuenciado. Esta es una bacteria perteneciente al género *Conexibacter*, el cual, representa el género tipo de la familia *Conexibacteraceae*, perteneciendo al filo *Actinobacteria*¹⁶. En el caso del primer KOF se cubría un 78% de la secuencia con un porcentaje de identidad del 73%, mientras que con el primer T7 se cubría el 99% con un porcentaje de identidad del 81%.

2. Resultados obtenidos con el Blastx:

-Usando la secuencia obtenida con KOF:

Tabla 10. Dos primeros resultados obtenidos al realizar el Blastx (se muestra el segundo ya que se corresponde con el primer resultado del Blastn).

Descripción	Puntuación máxima	Puntuación total	Query cover	E value	Identidad	Nº de acceso
<i>Serine/threonine protein kinase</i> [Solirubrobacterales bacterium URHD0059]	421	421	90%	9e-144	89%	WP_028074056.1
<i>Serine/threonine protein kinase</i> [Conexibacter woesei]	414	414	90%	8e-141	87%	WP_035125775.1

-Usando la secuencia obtenida con T7:

Tabla 11. Dos primeros resultados obtenidos al realizar el Blastx (se muestra el segundo ya que se corresponde con el primer resultado del Blastn).

Descripción	Puntuación máxima	Puntuación total	Query cover	E value	Identidad	Nº de acceso
<i>Serine/threonine protein kinase [Solirubrobacterales bacterium URHD0059]</i>	661	661	90%	0	89%	WP_028074056.1
<i>Serine/threonine protein kinase [Conexibacter woesei]</i>	648	648	90%	0	87%	WP_035125775.1

El Blastx se realizó con la intención de observar si en la porción de secuencia que teníamos se podía hallar una proteína o algún indicio de actividad lipolítica. Como podemos observar no obtuvimos dicho resultado, sino que, obtuvimos que lo más similar a dicha porción es una *serine/threonine protein kinase*, tanto del género *Solirubrobacterales bacterium* como de *Conexibacter woesei* (Tablas 10 y 11).

3. Los resultados de la secuenciación permitieron identificar la región del genoma de *Conexibacter woesei*¹⁶, que se espera tenga la máxima similitud con la secuencia clonada en nuestro vector de la genoteca. Se comprobó, mediante la base de datos UniProt si en la región que alineaba del genoma existían proteínas descritas con actividad lipolítica y se identificaron proteínas con una actividad no relacionada, una enzima con actividad peptidoglucano glicosiltransferasa y tres clasificadas como proteínas hipotéticas con función desconocida (Tabla 12).

Tabla 12. Proteínas procedentes de la región del genoma de *Conexibacter woesei*.

Descripción	Nº de acceso
<i>Conexibacter woesei hypothetical protein [3800..4117]</i>	GenBank: ADB48440.1
<i>Conexibacter woesei hypothetical protein [11243..11779]</i>	GenBank: ADB48445.1
<i>Conexibacter woesei hypothetical protein [11814..12941]</i>	GenBank: ADB48446.1
<i>Conexibacter woesei peptidoglycan glycosyltransferase [19109..20545]</i>	GenBank: ADB48452.1

5. Discusión

En este trabajo, partiendo de una metagenoteca del microbioma de aguas termales, se logró aislar un clon con actividad lipolítica usando placas con tributirina como sustrato. Respecto a la caracterización de la enzima, pudimos observar que no presenta actividad con sustratos de cadena corta como el octanoato ni de cadena larga como el estearato, sino que mantiene preferencia por un sustrato de longitud de cadena intermedia como es el laurato, con lo cual no se puede concluir si se trata de una esterasa o lipasa auténtica. Dicha enzima presentó una actividad óptima, aparentemente, a 90°C, por lo que podríamos estar hablando de que proceda de un organismo termófilo o hipertermófilo¹⁰, según cabría esperar dado el origen del ADN de la metagenoteca de partida. El óptimo de temperatura es bastante elevado en comparación con la mayoría de las actividades lipasa-esterasa termófilas descritas, que están en un rango de 50-65°C^{17,18}.

De cara al trabajo futuro con esta enzima, para poder caracterizarla mejor podríamos usar otros sustratos de diferentes longitudes de cadena, partiendo de los más cercanos al laurato, así como intentar precisar más la temperatura óptima de nuestra muestra, repitiendo los ensayos aquí realizados e intentando analizar su actividad a mayor temperatura, incluso más de 100°C, si esto fuera posible en las condiciones de laboratorio.

Respecto a la secuenciación del ADN, de la cual se obtuvieron los datos pertenecientes a los extremos del inserto, la mayor similitud observada fue con *Conexibacter woesei*, la cual pertenece al género de *Conexibacter* y filo *Actinobacterias*. El género *Conexibacter* sólo presenta tres especies descritas y todas ellas fueron aisladas a partir de suelo y son mesófilas, pero no se han caracterizado, hasta el momento, ni en agua ni tampoco en ambientes termófilos¹⁹. Las actinobacterias son uno de los grupos más diversos de microorganismos y varios géneros de éstas presentan enzimas con un vasto potencial en la industria biotecnológica y en campos biomédicos, además es un buen terreno por explorar ya que los géneros más recónditos de dicho filo no han sido manipulados o explorados hasta ahora²⁰.

Por todas las razones recogidas en esta caracterización previa, esta enzima es muy prometedora, y actualmente se está secuenciando el fósmino entero, para poder identificar la ORF responsable de la actividad lipolítica y clonarla en un vector de expresión para poder así purificarla y caracterizarla con mayor exactitud.

6. Conclusiones

1. Se ha aislado completamente un clon con actividad lipolítica, usando como sustrato de la actividad enzimática la tributirina, a partir de nuestra muestra M35F proveniente de una metagenoteca de la fuente termal de Muíño da Veiga.
2. La proteína codificada por el clon aislado presenta una actividad lipolítica observable sobre los sustratos tributirina y laurato. La ausencia de actividad sobre el octanoato y estearato no permite concluir si se trata de una esterasa o lipasa auténtica. Presenta aparentemente un óptimo de temperatura a los 90°C. En electroforesis en gel de poliacrilamida, condiciones desnaturizantes, nuestra muestra presenta tres bandas de tamaños 180 Kda, 72 Kda y 25 Kda, las cuales se podrían corresponder con la enzima producida por el clon aislado de la metagenoteca.
3. El organismo al que más se parece nuestra secuencia de ADN es a *Conexibacter woesei*, atendiendo al índice de identidad podemos decir que lo más probable es que sea del mismo género, pero no la misma especie.

6.b. Conclusión

1. Illouse completamente un clon con actividade lipolítica, usando como sustrato da actividade enzimática a tributirina, a partir da nosa mostra M35F dunha metaxenoteca da fonte termal de Muíño da Veiga.
2. A proteína codificada polo clon illado presenta una actividade lipolítica observable sobre os sustratos tributirina e laurato. A ausencia de actividade sobre o octanoato e o estearato non permite concluir se se trata dunha esterasa ou dunha lipasa auténtica. Presenta aparentemente un óptimo de temperatura aos 90°C. Na electroforesis en xel de poliacrilamida, condicións desnaturizantes, a mostra presenta tres bandas de tamaños 180 Kda, 72 Kda y 25 Kda, que se poderían corresponder coa enzima producida polo clon illado da metaxenoteca.
3. O organismo ao que máis se parece a nosa secuencia de ADN é a *Conexibacter woesei*, atendendo ao índice de identidade podemos dicir que o máis probable é que sexa do mesmo xénero, pero non da mesma especie.

6.c. Conclusions

1. A clone with lipolytic activity has been completely isolated, using tributyrin as substrate of the enzymatic activity, from our sample M35F from a metagenomic library of the hot spring at Muíño da Veiga.
2. The protein coded by the isolated clone shows lipolytic activity observable on the substrates tributyrin and laurate. The absence of activity on octanoate and estearate precludes concluding if it is an esterase or an authentic lipase. It shows apparently an optimum of temperature at 90°C (194°F). In electrophoresis in polyacrylamide gel, denaturing conditions, our sample shows three bands, of sizes 180 Kda, 72 Kda and 25 Kda, which could correspond to the enzyme produced by the clone isolated from the metagenotec.
3. The organism that most resembles our sequence is *Conexibacter woesei*; based on the identity index, we infer that it is likely the same gender, but not the same species.

7. Bibliografía

1. Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol.* 2006;39(2):235-251. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.10.016.
2. Jaeger KE, Reetz MT. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 1998;16(9):396-403. doi:10.1016/S0167-7799(98)01195-0.
3. Pedroza-Padilla CJ, Romero-Tabarez M, Orduz S. Actividad lipolítica de microorganismos aislados de aguas residuales contaminadas con grasas. *Biotechnol en el Sect Agropecu y Agroindustrial.* 2017;15(1):36-44. doi:10.18684/BSAA(15)36-44.
4. Sharma R, Chisti Y, Chand U, Banerjee UC. Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases. *Biotechnol Adv.* 2001;19(8):627-662. doi:10.1016/S0734-9750(01)00086-6.
5. Salleh, A.B., Rahman, R.N., Basri M, ed. *New Lipases and Proteases.* New York: Nova Science Publishers. Inc.; 2006.
6. Pereira MR, Mercaldi GF, Maester TC, Balan A, De Macedo Lemos EG. Est16, a new esterase isolated from a metagenomic library of a microbial consortium specializing in diesel oil degradation. *PLoS One.* 2015;10(7):1-16. doi:10.1371/journal.pone.0133723.
7. Lopez-Lopez O, Cerdan M, Siso M. New Extremophilic Lipases and Esterases from Metagenomics. *Curr Protein Pept Sci.* 2014;15(5):445-455. doi:10.2174/1389203715666140228153801.
8. Streit WR, Schmitz RA. Metagenomics - The key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol.* 2004;7(5):492-498. doi:10.1016/j.mib.2004.08.002.
9. Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J. Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities. *Annu Rev Genet.* 2004;38(1):525-552. doi:10.1146/annurev.genet.38.072902.091216.
10. DeCastro M-E, Rodríguez-Belmonte E, González-Siso M-I. Metagenomics of Thermophiles with a Focus on Discovery of Novel Thermozyms. *Front Microbiol.* 2016;7(SEP):1-21. doi:10.3389/fmicb.2016.01521.
11. Angelov A, Mientus M, Liebl S, Liebl W. A two-host fosmid system for functional screening of (meta)genomic libraries from extreme thermophiles. *Syst Appl Microbiol.* 2009;32(3):177-185. doi:10.1016/j.syapm.2008.01.003.
12. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1951;62(3):293-300. doi:citeulike-article-id:149214.
13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
14. Fuciños P, Abadín CM, Sanromán A, Longo MA, Pastrana L, Rúa ML. Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB27: Partial purification and preliminary biochemical characterisation. *J Biotechnol.* 2005;117(3):233-241. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.01.019.
15. Lee S-W, Won K, Lim HK, Kim J-C, Choi GJ, Cho KY. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;65(6):720-726. doi:10.1007/s00253-004-1722-3.
16. Pukall R, Lapidus A, Glavina Del Rio T, et al. Complete genome sequence of *Conexibacter*

woesei type strain (ID131577 T). *Stand Genomic Sci.* 2010;2(2):212-219.
doi:10.4056/sigs.751339.

17. Ferrer M, Golyshina O, Beloqui A, Golyshin PN. Mining enzymes from extreme environments. *Curr Opin Microbiol.* 2007;10(3):207-214. doi:10.1016/j.mib.2007.05.004.
18. Poddar A, Das SK. Microbiological studies of hot springs in India: a review. *Arch Microbiol.* 2018;200(1):1-18. doi:10.1007/s00203-017-1429-3.
19. Seki T, Matsumoto A, Shimada R, Inahashi Y, Omura S, Takahashi Y. *Conexibacter arvalis* sp. nov., isolated from a cultivated field soil sample. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012;62(10):2400-2404. doi:10.1099/ijs.0.036095-0.
20. Mukhtar S, Zaheer A, Aiysha D, Abdulla Malik K, Mehnaz S. Actinomycetes: A Source of Industrially Important Enzymes. *J Proteomics Bioinform.* 2017;10(12):316-319. doi:10.4172/jpb.1000456.

8. Anexo 1: Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico.

LB: medio Luria-Bertani

°C: grados centígrados

°F: grados fahrenheit

%: tanto por ciento

ARNr: ácido ribonucleico ribosómico

BACs: cromosomas artificiales bacterianos

L: litro/s

µm: micrómetro/s

E. coli: Escherichia coli

g: gramo/s

Bar: bares de presión

min: minutos

µg: microgramo/s

mL: mililitro/s

µL: microlitro/s

nm: nanómetro/s

h: hora/s

rpm: revoluciones por minuto

TRIS: tris(hidroximetil)aminometano

M: molar

mM: micromolar

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

mg: miligramo/s

SDS: dodecilsulfato sódico

APS: persulfato amónico

TEMED: tetrametiletilendiamina

Ác: ácido

V: voltio/s

pNP: paranitrofenol

Abs: absorbancia

TT: tratamiento térmico

C: átomos de carbono

Kda: kilodalton/s