



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

**ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE UN CLON LIPOLÍTICO DERIVADO DE UNA
BIBLIOTECA METAGENÓMICA DE SUELO DE BOSQUE ALTO ANDINO DEL
PARQUE NACIONAL NATURAL LOS NEVADOS**

ANDERSON RUIZ GÓMEZ

Director:

JOSE SALVADOR MONTAÑA LARA

Codirector:

DANIEL ENRIQUE BORDA MOLINA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

para optar por el título de Microbiólogo Industrial

BOGOTÁ D.C.

JUNIO DE 2013

**ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE UN CLON LIPOLITICO DERIVADO DE UNA
BIBLIOTECA METAGENÓMICA DE SUELO DE BOSQUE ALTO ANDINO DEL
PARQUE NACIONAL NATURAL LOS NEVADOS**



ANDERSON RUIZ GÓMEZ

APROBADO

INGRID SCHULER
Bióloga Ph.D.
Decana Académica

JANETH ARIAS PALACIOS
Bacterióloga MSc.
Directora de carrera

**ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE UN CLON LIPOLITICO DERIVADO DE UNA
BIBLIOTECA METAGENÓMICA DE SUELO DE BOSQUE ALTO ANDINO DEL
PARQUE NACIONAL NATURAL LOS NEVADOS**



ANDERSON RUIZ GÓMEZ

APROBADO

JOSÉ SALVADOR MONTAÑA
Biólogo Cd Ph.D.
Director

DANIEL ENRIQUE BORDA
Microbiólogo Industrial-Agrícola y
Veterinario Cd MSc.
Codirector

MARÍA XIMENA RODRÍGUEZ
Microbióloga, Ph.D.
Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se ve en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro Colombiano de Genómica y Bioinformática de Ambientes Extremos GeBiX por permitirme llevar a cabo este proyecto.

A la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental, USBA por su colaboración.

A José Salvador Montaña por darme la oportunidad de pertenecer a GeBiX, por sus grandes aportes, por su apoyo y por la confianza que deposito en mí.

A Daniel Borda por su paciencia, por su ayuda, y por acompañarme dentro de este proceso.

A mi jurado, María Ximena Rodríguez por su tiempo y sus valiosos aportes.

A mi Familia por apoyarme en cada momento de mi vida, por guiarme y por darme la fuerza para seguir adelante cada día.

A mis amigos y compañeros de GeBiX y de USBA por hacer más alegre y grata mi estancia durante este tiempo.

A mi novia Diana por ser tan comprensiva, por apoyarme, por preocuparse por mí y por quererme tanto.

A Laura Sánchez por ayudarme y darme fuerza en tantos momentos.

A José Miguel Aldana por creer en mí, por darme valor y por ser un apoyo en los momentos difíciles.

A todos mis amigos y amigas que me han brindado grandes momentos y alegrías.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Enzimas lipolíticas.....	4
2.2 Metagenómica.....	8
2.3 Ecosistema del Parque Nacional Natural Los Nevados.....	10
3. OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo General.....	12
3.2 Objetivos Específicos.....	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1 Clon metagenómico BAA 3C3.....	13
4.2 Evaluación de la cinética de crecimiento del clon metagenómico.....	13
4.3 Confirmación de la actividad lipolítica.....	13
4.4 Determinación de la especificidad de sustrato mediante la técnica de pNP-esteres.....	14
4.5 Evaluación de la actividad lipolítica a diferentes temperaturas.....	15
4.6 Evaluación de la actividad lipolítica a diferentes valores de pH.....	15
4.7 Análisis estadístico para la actividad lipolítica.....	15
4.8 Cuantificación de proteínas totales.....	15
4.9 Análisis del inserto metagenómico y búsqueda del gen lipolítico.....	16
4.9.1 Extracción del ADN plasmídico.....	16
4.9.2 Secuenciación y búsqueda de ORFs.....	16
4.9.3 Análisis de ORFs y búsqueda de motivos.....	17
4.9.4 Relación entre la secuencia del ORF 1 y las familias de enzimas lipolíticas.....	18
4.9.5 Comparación de los ORFs 1, 4 y 5 con la esterasa del clon BAA 3G2.....	18
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
5.1 Confirmación de la actividad lipolítica.....	19
5.2 Cinética de crecimiento del Clon BAA 3C3.....	19
5.3 Evaluación cuantitativa de la actividad lipolítica mediante la técnica de pNP-Esteres.....	20
5.3.1 Determinación de la capacidad de hidrólisis sobre diferentes sustratos y velocidad de reacción.....	20
5.3.2 Evaluación de la actividad lipolítica a diferentes temperaturas.....	23
5.3.3 Evaluación de la actividad lipolítica a diferentes pH.....	25
5.4 Caracterización inicial del inserto metagenómico y análisis bioinformático.....	27
5.4.1 Determinación del tamaño del inserto metagenómico.....	27
5.4.2 Búsqueda de ORFs.....	28
5.4.3 Búsqueda de regiones promotoras y construcción del contexto genómico.....	31
5.4.4 Búsqueda de motivos.....	32
5.5 Árbol de distancias y comparación de secuencias con la esterasa del clon BAA 3G2.....	34
6 CONCLUSIONES	38
7 RECOMENDACIONES	39
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
9 ANEXOS	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de la síntesis e hidrólisis de triacilgliceroles llevado a cabo por lipasas. Glicerol (G), Monoglicéridos (MG), Diglicéridos (DG) y Triglicéridos (TG). Fuente: Kapoor <i>et al</i> (2012).....	4
Figura 2. Esquema general de una α/β hidrolasa. Las láminas β (1-8) se muestran como flechas azules, las α hélices se muestran como cilindros rojos. Las posiciones relativas de los aminoácidos que componen la triada catalítica se indican con círculos rojos. Fuente: Bornscheuer (2002).....	6
Figura 3. Esquema general para el análisis de un metagenoma. Recolección de la muestra ambiental (I). Extracción del ADN metagenómico (II). Análisis de la diversidad microbiana mediante amplificación de genes ribosomales 16S y/o a través de la restricción del ADN, con su posterior clonación en vectores (III). Búsqueda de funciones o actividades enzimáticas (IV). Fuente: Hernández <i>et al</i> (2010).....	10
Figura 4. Halos de hidrólisis generados por el clon BAA 3C3 correspondientes al día 15 en agar LB suplementado con Tributirina 1% (v/v), Tritón X-100 0,01% (v/v), 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y 12,5 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina. Fuente: Autor.....	19
Figura 5. Cinética de crecimiento del clon BAA 3C3. Fuente: Autor.....	20
Figura 6. Actividad lipolítica del clon BAA 3C3 sobre diferentes sustratos lipídicos empleando como diluyente acetonitrilo. Fuente: Autor.....	22
Figura 7. Actividad lipolítica del clon BAA 3C3 sobre pNP-Acetato y pNP-Butirato empleando como diluyente isopropanol. Fuente: Autor.....	22
Figura 8. Cuantificación de la actividad lipolítica del clon BAA 3C3 a diferentes temperaturas en pNP-Butirato. Fuente: Autor.....	24
Figura 9. Cuantificación de la actividad lipolítica del clon BAA 3C3 a diferentes temperaturas en pNP-Acetato. Fuente: Autor.....	25
Figura 10. Cuantificación de la actividad lipolítica del clon BAA 3C3 a diferentes pH en pNP-Butirato. Fuente: Autor.....	26
Figura 11. Cuantificación de la actividad lipolítica del clon BAA 3C3 a diferentes pH en pNP-Acetato. Fuente: Autor.....	27

Figura 12. ADN plasmídico del clon BAA 3C3 digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *SacI* La banda superior corresponde al vector linearizado (3000 pb) y las otras dos bandas corresponden al inserto metagenómico digerido por cualquiera de las enzimas. Fuente: Autor..28

Figura 13. Contexto genómico probable. En la parte izquierda se indican los Frame. Las flechas indican los ORFs predichos y su ubicación dentro de la secuencia. Fuente: Autor.....32

Figura 14. Árbol de distancias neighbor-joining de las familias de enzimas lipolíticas. El alineamiento y la construcción del árbol se realizaron utilizando los parámetros por defecto del programa CLUSTALW2. Fuente: Autor.....37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias entre lipasas (EC 3.1.1.3) y esterases (EC 3.1.1.1). Fuente: Bornscheuer (2002).....	5
Tabla 2. Algunos animales, plantas y microorganismos productores de enzimas lipolíticas. Fuente: Kapoor <i>et al</i> (2012).....	7
Tabla 3. Aplicaciones de lipasas (EC 3.1.1.3) y esterases (EC 3.1.1.1) en la industria. Fuente: Kapoor <i>et al</i> (2012).....	8
Tabla 4. Programas bioinformáticos utilizados para la búsqueda de ORFs y determinación del porcentaje guanina-citosina en la secuencia metagenómica. Fuente: Autor.....	17
Tabla 5. Programas y bases de datos utilizadas para el análisis de ORFs. Fuente: Autor.....	18
Tabla 6. ORFs mayores a 50 aminoácidos y con algún referente significativo en la base de datos NCBI-NR utilizando BLASTP. Fuente: Autor.....	29
Tabla 7. ORFs mayores a 50 aminoácidos y con algún referente significativo en la base de datos Esther Database utilizando BLASTP. Fuente: Autor.....	30
Tabla 8. Posibles secuencias Shine-Dalgarno y posibles cajas Pribnow de los ORFs predichos. Fuente: Autor.....	31
Tabla 9. Contextos genómicos similares a los obtenidos en este trabajo. Fuente: Autor.....	33
Tabla 10. Posibles motivos y aminoácidos basados en distancia que podrían estar asociados a la triada catalítica y al hoyo oxianión.....	34
Tabla 11. Peso molecular, punto isoelectrico y % de aminoácidos de los ORFs 1 (Carboxilesterasa), 4 (Cutinasa) y 5 (regulador transcripcional) establecidos mediante ProtParam.....	35
Tabla 12. Alineamiento entre los ORFs 1,4 y 5 y la esterasa del clon BAA 3G2 utilizando el programa CLUSTALW2.....	36

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo extracción y purificación de ADN plasmídico <i>Miniprep</i> (Lisis alcalina). Sambrook 2001.....	52
Anexo 2. Protocolo de preparación de células electrocompetentes.....	53
Anexo 3. Curva patrón pNP-esteres.....	55
Anexo 4. Curva patrón Bradford.....	56
Anexo 5. Análisis estadístico temperatura.....	57
Anexo 6. Análisis estadístico pH.....	60

RESUMEN

Con el objetivo de caracterizar el inserto metagenómico del clon BAA 3C3 proveniente de una biblioteca metagenómica de suelo de Bosque Alto Andino del Parque Nacional Natural Los Nevados, se confirmó la actividad lipolítica del clon BAA 3C3 sobre medio Luria Bertani (LB) suplementado con 1% (v/v) de Tributirina como sustrato y se cuantificó la actividad lipolítica empleando la técnica de pNP esteres. Adicionalmente se secuenció el inserto metagenómico utilizando el método gene walking con el fin de establecer que gen o genes podrían estar relacionados con la actividad lipolítica y con el objetivo de determinar cuál era el posible contexto genómico. La incubación a 6°C por 15 días permitió observar la formación de halos de aclaramiento alrededor de las colonias generados por la hidrólisis de la tributirina. Los resultados obtenidos mediante la técnica de pNP-esteres mostraron que la enzima lipolítica del clon tiene preferencia por ácidos grasos de cadena corta y una actividad específica de 6,97 U/mg (+/- 0,141, 60°C, pH 7) en pNP-Acetato y de 1,59 U/mg (+/- 0,375, 60°C, pH 7) en pNP-Butirato. De otro lado los resultados obtenidos por la secuenciación permitieron determinar un tamaño de inserto de 4899 pb. El análisis de la secuencia mediante ORF finder, permitió establecer 5 ORFs que se encuentran asociados a: carboxilesterasa, metiltransferasa, Acil-CoA deshidrogenasa, cutinasa y un regulador transcripcional respectivamente. La clasificación del ORF 1 (Carboxilesterasa) mediante la construcción de un árbol de distancias construido con base en secuencias de enzimas lipolíticas de las diferentes familias descritas por Arpigny y Jaeger (1999), agrupó a la enzima codificada por el ORF 1 dentro de la familia III.

Las pruebas realizadas para evaluar la estabilidad de la enzima responsable de la actividad lipolítica del clon BAA 3C3, sugieren que el clon expresa una esterasa termoestable, activa a pH neutro y ligeramente alcalino. El análisis del ORF 1 asociado a una carboxilesterasa sugiere que la enzima expresada por este gen podría ser la responsable de la actividad lipolítica del clon BAA 3C3.

1. INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La necesidad de nuevos biocatalizadores para ser empleados en los campos ambiental, industrial y farmacéutico, entre otros, ha generado que la biotecnología actual se enfoque en la búsqueda e identificación de genes y metabolitos, en organismos de diversos ambientes (Elend *et al* 2006, Streit *et al* 2004). Sin embargo se encuentra documentado que aproximadamente el 95% de los microorganismos, en la mayoría de ecosistemas no puede ser cultivado, lo cual genera una gran dificultad al momento de realizar la búsqueda de enzimas y/o productos codificados en el ADN de dichos microorganismos (Streit *et al* 2004, Berlemont *et al* 2011).

Los avances en los métodos de biología molecular, han permitido acceder a la información de genomas provenientes de comunidades microbianas complejas de hábitats naturales (metagenoma), a través de la construcción de bibliotecas metagenómicas o del análisis directo del ADN previamente secuenciado con los métodos disponibles, para la búsqueda y exploración de nuevos genes que pueden ser empleados en bioprospección (Elend *et al* 2006). Estos desarrollos han permitido entre otras cosas, la identificación y clasificación taxonómica de microorganismos presentes en hábitats naturales (Montaña *et al* 2011) y la clonación y expresión de ADN metagenómico originario de dichos hábitats (Streit *et al* 2004, , Jiménez *et al* 2012).

Los procesos industriales que requieren enzimas emplean generalmente altas y bajas temperaturas, razón por la cual se buscan enzimas adaptadas a los cambios de temperatura, que no es posible encontrar en las enzimas mesofílicas convencionales. Esto no solamente ha generado la búsqueda de enzimas lipolíticas termoestables, sino que además exhiban propiedades específicas como estabilidad a diferentes pH, selectividad y especificidad por el sustrato (Tirawongsaroj *et al* 2008).

Con el objetivo de caracterizar ambientes extremos y realizar bioprospección de recursos genéticos en Colombia, se conformó el Centro Colombiano de Genómica y Bioinformática de Ambientes Extremos (GeBiX) el cual trabaja en el establecimiento de una plataforma metagenómica y bioinformática desde el año 2008, empleando como modelo de estudio el Parque Nacional Natural los Nevados (PNN) (Centro Colombiano de Genómica y Bioinformática de Ambientes Extremos 2013).

Uno de los objetivos del GeBiX es la búsqueda de nuevas enzimas lipolíticas. En un trabajo previo, dos clones (BAA3C3 y BAA3G2) derivados de una biblioteca metagenómica de suelo de bosque alto andino del PNN, fueron seleccionados por presentar actividad esterasa en Tributirina como sustrato. La librería fue construida en *Escherichia coli* genotipo XL1Blue de Stratagene,

usando el plásmido p-Bluescript II SK+ y las enzimas de restricción *KpnI* y *SacI* (Montaña *et al* 2011).

Con el fin de caracterizar el inserto de ADN metagenómico presente en el clon BAA3C3 (proveniente de una biblioteca metagenómica de suelo de bosque alto andino) responsable de la actividad lipolítica, en este trabajo se llevó a cabo la caracterización del clon, la extracción y purificación del plásmido que contiene el inserto de ADN metagenómico, su secuenciación y posterior análisis, haciendo uso de herramientas bioinformáticas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Enzimas lipolíticas

Las enzimas lipolíticas pertenecen a la superfamilia de las α/β hidrolasas (Ollis *et al* 1992, Nagarajan 2012, Jiménez *et al* 2012, Kapoor *et al* 2012, Asoodeh *et al* 2013), estas se clasifican dentro de tres grupos: las carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) que hidrolizan pequeños esteres y triglicéridos de cadena corta (Arpigny y Jaeger 1999, Bornscheuer 2002), las triacilglicerol hidrolasas o lipasas verdaderas (EC 3.1.1.3) que catalizan la hidrólisis de grasas y aceites liberando ácidos grasos, diglicéridos, monoglicéridos y glicerol (**Figura 1**) (Nagarajan 2012, Kapoor *et al* 2012) y las fosfolipasas (EC 3.1.1.2) (Jaeger y Eggert 2002) (Jiménez *et al* 2012)

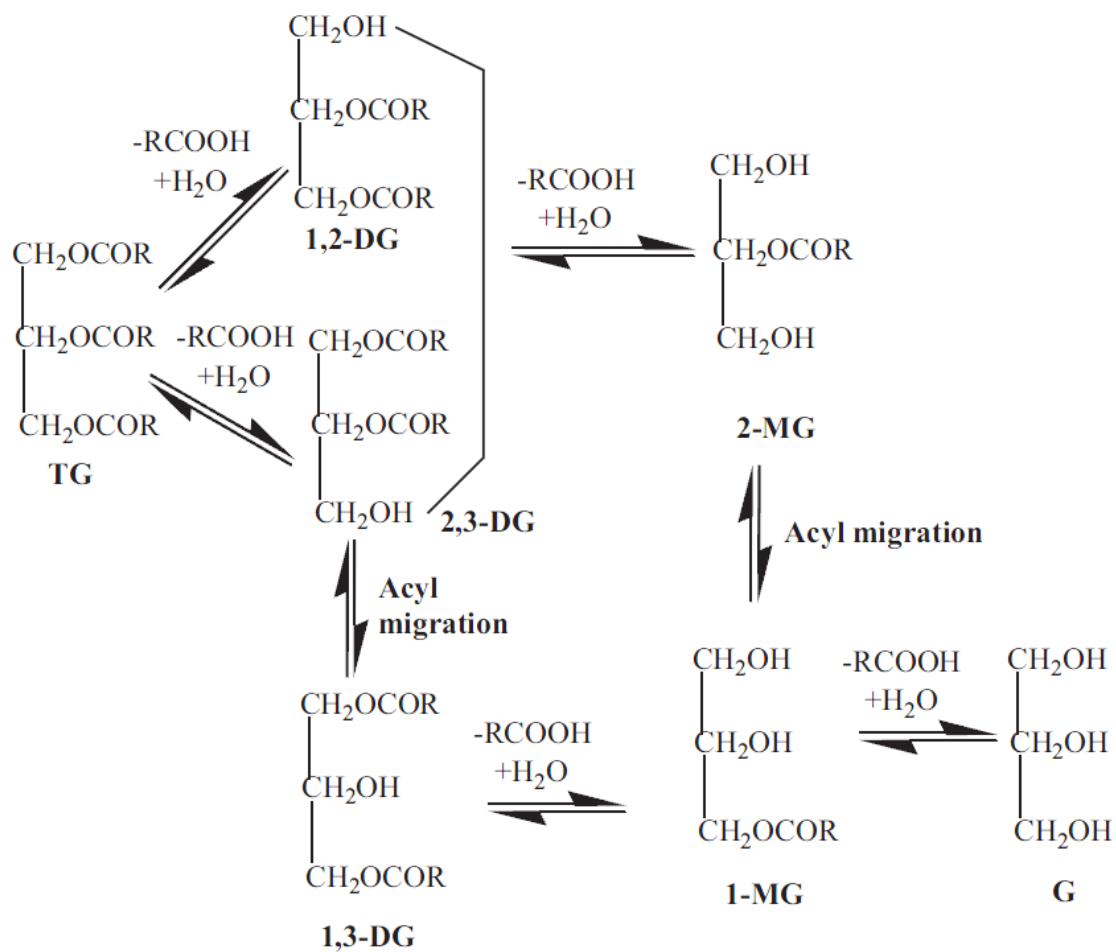


Fig. 1. Esquema general de la síntesis e hidrólisis de triacilglicerol llevado a cabo por lipasas. Glicerol (G), Monoglicéridos (MG), Diglicéridos (DG) y Triglicéridos (TG). Fuente: Kapoor *et al* (2012).

Las lipasas (EC 3.1.1.3) y las esterasas (EC 3.1.1.1) comparten una gran variedad de similitudes, sin embargo existen algunas características que permiten su distinción (**Tabla 1**), un ejemplo de esto es el fenómeno de activación interfacial (Bornscheuer 2002).

Tabla 1. Diferencias entre lipasas (EC 3.1.1.3) y esterasas (EC 3.1.1.1). Fuente: Bornscheuer (2002)

Propiedad	Lipasas (EC 3.1.1.3)	Esterasas (EC 3.1.1.1)
Sustratos preferidos	Triglicéridos de cadena larga, alcoholes secundarios	Esteres simples, triglicéridos de cadena corta
Activación interfacial/lid	Si	No
Hidrofobicidad del sustrato	Alta	Alta-Baja
Enantioselectividad	Usualmente alta	Alta-Baja-Nula
Estabilidad en solventes	Alta	Alta-Baja

Las enzimas lipolíticas están compuestas por una triada catalítica constituida de Serina (algunas veces remplazada por Ácido aspártico ó Cisteína), Ácido aspártico (algunas veces remplazado por Ácido glutámico) e Histidina (**Figura 2**) (Arpigny y Jaeger 1999, Bornscheuer 2002). Adicionalmente poseen una secuencia consenso Gly (Ala)-X_{aa}-Ser-X_{aa}-Gly que incluye la Serina del sitio activo, que se encuentra generalmente en el centro de una lámina β denominado bolsillo catalítico, y un motivo HG perteneciente al hoyo oxianión (Arpigny y Jaeger 1999, Bornscheuer 2002, Nagarajan 2012, Asoodeh *et al* 2013).

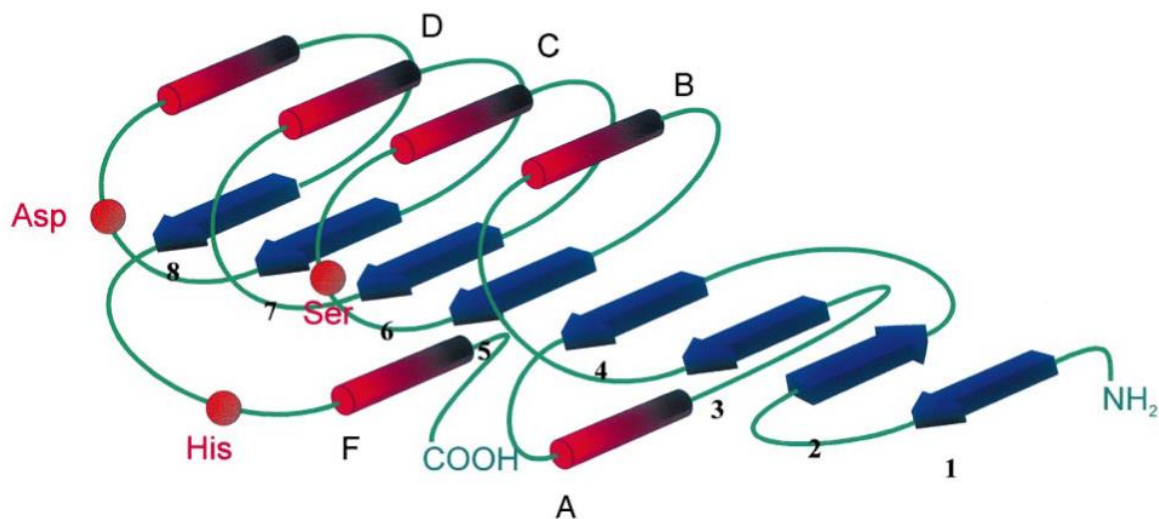


Fig. 2. Esquema general de una α/β hidrolasa. Las láminas β (1-8) se muestran como flechas azules, las α hélices se muestran como cilindros rojos. Las posiciones relativas de los aminoácidos que componen la triada catalítica se indican con círculos rojos. Fuente: Bornscheuer (2002).

Las enzimas lipolíticas poseen un mecanismo de acción semejante al de las proteasas debido a la similitud de la triada catalítica en ambas (Kapoor *et al* 2012). El mecanismo de acción se basa en el ataque nucleofílico del grupo hidróxilo de la Serina del sitio activo sobre el carbono del enlace éster del sustrato lipídico. Esto da lugar a la formación de un intermediario tetraédrico que luego pierde una molécula de alcohol para dar lugar a un intermediario acil-enzima. Posteriormente una molécula de agua realiza un ataque nucleofílico al complejo para formar un intermediario tetraédrico, que por último pierde una molécula de ácido dando lugar a la forma nativa de la enzima (Bornscheuer *et al* 2002, Kapoor *et al* 2012).

La actividad lipolítica puede ser determinada por la liberación de ácidos grasos o glicerol provenientes de la hidrólisis de triacilglicerolos. Esto puede realizarse de manera cualitativa (Ensayo de difusión en gel) o de manera cuantitativa (Titulometría, ensayos colorimétricos, fluorescencia, cromatografía e inmunoensayos) (Gupta *et al* 2003, Nagarajan 2012).

Dichas enzimas poseen una gran variedad de características que las hacen distintivas, algunas de ellas son: su quimio, su regio, su estereo, ó enantioselectividad, su estabilidad en solventes orgánicos, su estabilidad en diferentes pH y temperaturas, su capacidad de romper y formar enlaces éster, y su capacidad de funcionar en ausencia de cofactores (Jaeger *et al* 2002, Bornscheuer *et al* 2002, Gupta *et al* 2004, Kapoor *et al* 2012, Nagarajan 2012, Asoodeh *et al* 2013).

Además estas enzimas pueden obtenerse de animales, plantas y microorganismos (**Tabla 2**) (Arpigny y Jaeger 1999, Messaoudi *et al* 2010, Nagarajan 2012, Kapoor *et al* 2012, Asoodeh *et al*

2013). Sin embargo, las lipasas microbianas presentan ciertas ventajas sobre otras enzimas para aplicaciones industriales algunas de ellas son: tiempos de generación cortos, fácil manipulación genética, fácil escalado, fácil purificación, amplia especificidad de sustrato, reacciones de síntesis e hidrólisis relevantes a nivel industrial que pueden realizarse en medios acuosos y no acuosos, estabilidad bajo diferentes condiciones (pH y temperatura) y bajos costos de producción (Nagarajan 2012).

Tabla 2. Algunos animales, plantas y microorganismos productores de enzimas lipolíticas. Fuente: Kapoor *et al* (2012).

Fuente de la enzima lipolítica	Organismo	Referencia
Bacterias	<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	Krishna <i>et al.</i> (2002)
	<i>Burkholderia glumae</i> (<i>Pseudomonas glumae</i>)	Schmid <i>et al.</i> (1998)
	<i>Burkholderia cepacia</i> (<i>Pseudomonas cepacia</i>)	Schmid <i>et al.</i> (1998)
	<i>Bacillus subtilis</i>	-
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Godfrey (1995)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Godfrey (1995)
Hongos	<i>Aspergillus niger</i>	Godfrey (1995)
	<i>Candida rugosa</i> (<i>Candida cylindracea</i>)	Godfrey (1995)
	<i>Candida antarctica A</i>	Krishna <i>et al.</i> (2002)
	<i>Candida antarctica B</i>	Schmid <i>et al.</i> (1998)
	<i>Geotrichum candidum</i>	Schmid <i>et al.</i> (1998)
	<i>Mucor javanicus</i>	Contesinia <i>et al.</i> (2010)
	<i>Penicillium camembertii</i> (<i>Penicillium cyclopeum</i>)	Schmid <i>et al.</i> (1998)
	<i>Penicillium expansum</i>	-
	<i>Rhizomucor miebei</i> (<i>Mucor miebei</i>)	Godfrey (1995)
	<i>Rhizopus delemar</i>	Contesinia <i>et al.</i> (2010)
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Schmid <i>et al.</i> (1998)
	<i>Rhizopus niveus</i>	Ribeiro <i>et al.</i> (2011)
<i>Thermomyces lanuginosa</i> (<i>Humicola lanuginosa</i>)	Fernandez <i>et al.</i> (2010), Schmid <i>et al.</i> (1998)	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Ribeiro <i>et al.</i> (2011)	
Plantas	<i>Brassica napus</i> (<i>rapeseed</i>)	Hills <i>et al.</i> (1990)
Animales	<i>Canis lupus familiaris</i> (perros)	-
	<i>Equus caballus</i> (equinos)	-
	<i>Porcine pancreatic lipase</i>	Schmid <i>et al.</i> (1998)
	<i>Human pancreatic lipase</i>	Schmid <i>et al.</i> (1998)
	<i>Sus scrofa</i> (oso salvaje)	-

Tanto las lipasas (EC 3.1.1.3) como las estererasas (EC 3.1.1.1) tienen una gran variedad de aplicaciones en diferentes sectores (**Tabla 3**), algunos de sus principales usos son en la industria

de detergentes, la industria de alimentos, la industria de la pulpa y el papel, la industria oleoquímica, en agroquímicos, en cosméticos, en sabores, en diagnóstico, en terapéutica, en la industria del cuero, en la producción de biodiesel y en la síntesis de biopolímeros (Nagarajan 2012, Kapoor *et al* 2012)

Tabla 3. Aplicaciones de lipasas (EC 3.1.1.3) y esterases (EC 3.1.1.1) en la industria. Fuente: Kapoor *et al* (2012).

Reacción llevada a cabo	Industria	Producto/Aplicación	Referencias
Hidrolisis de grasas	Detergentes	Remoción de manchas de aceite de las telas	Hasan <i>et al</i> (2006)
Hidrolisis de grasas de la leche, maduración del queso	Lácteos	Desarrollo de agentes saborizantes en leche, queso y mantequilla	Kempler (1983)
Hidrólisis	Lácteos	Mejora del sabor y calidad en las bebidas, carne, y productos de pescado	Vulfson <i>et al</i> (1994)
Hidrólisis	Cuero	Productos de cuero	Hasan <i>et al</i> (2006)
Hidrólisis	Papel	Papel con calidad mejorada	Vulfson <i>et al</i> (1994)
Transesterificación en aceites/grasas	Aceites naturales	Mantequilla de cacao	Bloomer <i>et al</i> (1990)
Esterificación y transesterificación	Sabores y fragancias	Síntesis de esteres con sabor natural	Krishna <i>et al</i> (2000)
Glicerólisis de aceites/grasas	Surfactantes	Monoglicéridos para surfactantes	Schmid <i>et al</i> (1998), Margolin (1993), Bornscheuer <i>et al</i> (2000)
Resolución de alcoholes/esteres racemicos	Drogas y farmacia	Componentes básicos para fármacos quirales e insecticidas	Hasan <i>et al</i> (2006)
Transesterificación	Combustibles	Biocombustible	Antczak <i>et al</i> (2009)
Acilación de polialcoholes	Surfactantes	Poliésteres monoacilo para surfactantes	Chopineau <i>et al</i> (1988)

2.2 Metagenómica

El estudio de la diversidad microbiana y sus metabolitos se ha estudiado tradicionalmente mediante técnicas convencionales de cultivo en laboratorio (Cultivo dependientes) (Hernández *et al* 2010). Sin embargo, se ha estimado que solamente alrededor de un 5-15% de los

microorganismos pueden ser cultivados bajo condiciones de laboratorio (Sipkema *et al* 2011, Amann *et al* 1995, Singh *et al* 2009), lo cual se ha atribuido entre otras cosas a la presión selectiva que ejercen las condiciones normales de trabajo en laboratorio y al desconocimiento de los requerimientos nutricionales y fisiológicos de estos microorganismos (Staley *et al* 1985, Singh *et al* 2009, Hernández *et al* 2010).

Actualmente las técnicas independientes de cultivo (PLFA, metagenómica, metaproteómica, microscopia de fluorescencia, etc.) han generado el acceso a esta fracción de microorganismos desconocidos, los cuales representan entre un 80 y un 90% de la población microbiana de varios ecosistemas incluyendo el suelo, que se ha estimado podría llegar a tener hasta 7000 especies por gramo. (Curtis *et al* 2004, Hernández *et al* 2010, Jiménez *et al* 2012). Una de estas técnicas es la metagenómica la cual ha permitido esclarecer las funciones de comunidades microbianas, realizar análisis genómicos y buscar nuevos genes codificadores de proteínas, que podrían generar nuevas o mejores actividades metabólicas (Hernández *et al* 2010, Berlemont *et al* 2011).

La búsqueda de enzimas lipolíticas a partir de un metagenoma se puede hacer mediante el análisis basado en secuencias nucleotídicas, empleando primers y/o sondas diseñados para la detección de secuencias génicas asociadas a lipasas, o se puede realizar mediante el análisis basado en función a través del tamizaje funcional, es decir verificando la actividad lipolítica de un microorganismo recombinante en un determinado sustrato (**Figura 3**) (Handelsman 2004, Ghazanfar *et al* 2010, Jiménez *et al* 2012, Hernández *et al* 2010). Sin embargo el tamizaje funcional presenta un valor agregado, ya que permite descubrir enzimas lipolíticas novedosas (Ferrer *et al* 2007).

El análisis de las secuencias obtenidas por clonación permite identificar y caracterizar genes y funciones de microorganismos no cultivables mediante la asignación de COGs (Cluster Ontology Genes), vías metabólicas (KEGG), marcos abiertos de lectura (ORFs), dominios y motivos conservados (Tringe *et al* 2005, Huson *et al* 2009, Jiménez *et al* 2012).

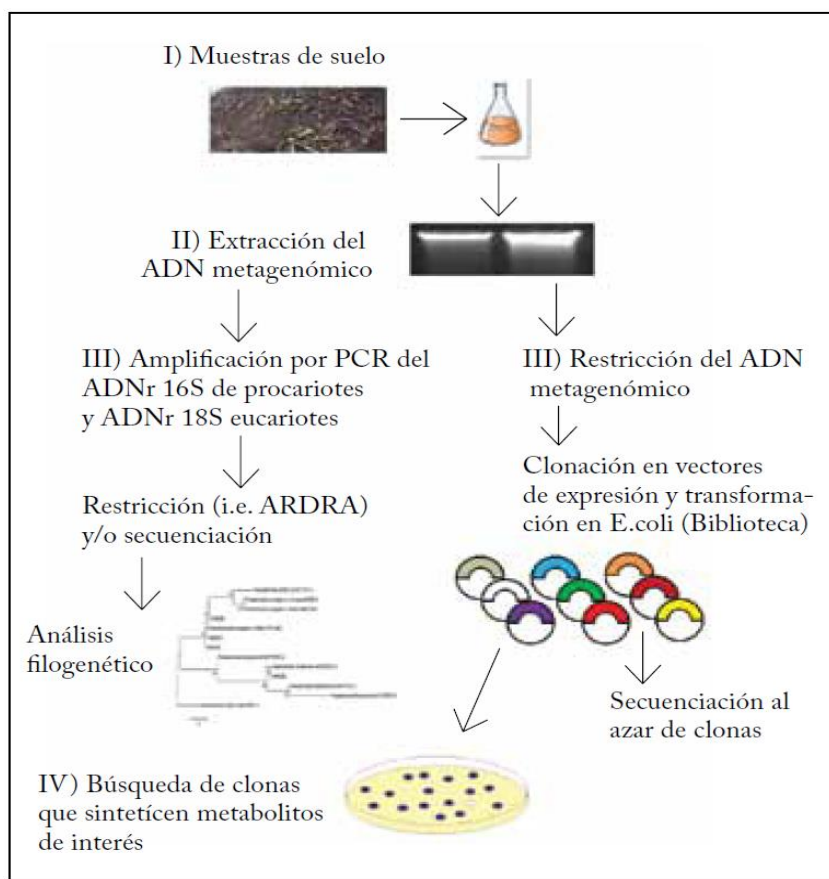


Fig. 3. Esquema general para el análisis de un metagenoma. Recolección de la muestra ambiental (I). Extracción del ADN metagenómico (II). Análisis de la diversidad microbiana mediante amplificación de genes ribosomales 16S y/o a través de la restricción del ADN, con su posterior clonación en vectores (III). Búsqueda de funciones o actividades enzimáticas (IV). Fuente: Hernández *et al* (2010).

Partiendo del tamizaje funcional de metagenomas se han encontrado fosfolipasas del tipo patatina y estererasas pertenecientes a la familia V en sedimentos de fuentes termales (Tirawongsaroj *et al* 2008). Otros autores reportan por este mismo método el hallazgo de estererasas pertenecientes a las familias V, VI y VIII; además se describen nuevas estererasas que no pueden ser clasificadas en dichas familias, todas estas provenientes de metagenomas de suelos forestales y pastizales de Alemania (Nacke *et al* 2011).

2.3 Ecosistema del Parque Nacional Natural Los Nevados

En Colombia, debido a su posición geostacionaria, es posible encontrar diversos ecosistemas que representan un interés para el estudio de la biodiversidad y bioprospección. Uno de los lugares que representa un particular interés es el Parque Nacional Natural Los Nevados. Este se ubica entre los departamentos de Caldas, Risaralda, Quindío y Tolima, a una altura que va desde los 2600 hasta los 5321 msnm, siendo una de las reservas hídricas Colombianas que cuenta con ambientes extremos poco estudiados a nivel microbiológico como: aguas termoácidas,

sulfataras volcánicas, lagunas a bajas temperaturas, nieves perpetuas, suelos desérticos y con temperaturas bajas las cuales fluctúan entre los 3°C y los 14°C, (Montaña *et al* 2011, Parques Nacionales Naturales de Colombia 2012). En el PNN se encuentra el ecosistema de bosque alto andino el cual representa el 8.1% del área total, presentando una alta diversidad biológica y cumpliendo funciones como la regulación del flujo hídrico y la acumulación y distribución de nutrientes provenientes de los páramos, al igual cuenta con ecosistema de páramo, súper páramo y nieves perpetuas representando el 66%, 21% y 5% del área total del parque respectivamente (Van Wyngaarden y Fandiño 2002, Parques Nacionales Naturales de Colombia 2012). El parque presenta condiciones fisicoquímicas que oscilan entre los valores límites para la supervivencia de un organismo, motivo por el cual se convierte en una amplia fuente de enzimas y microorganismos con características específicas (Montaña *et al* 2011, Jiménez *et al* 2012).

Mediante el tamizaje funcional, GeBiX ha encontrado en trabajos previos con metagenomas de bosque alto andino, una esterasa que podría pertenecer a una nueva familia de lipasas, posiblemente proveniente del genoma una Actinobacteria aún no descrita según análisis filogenéticos (Jiménez *et al* 2012). Razón por la cual es importante seguir en la búsqueda y exploración de nuevas lipasas provenientes del ecosistema de bosque alto andino.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Caracterizar el inserto que confiere la actividad lipolítica del clon BAA3C3 proveniente de una biblioteca metagenómica de suelo de bosque alto andino del PNN.

3.2 Objetivos específicos

- Confirmar la capacidad lipolítica del clon BAA3C3 y evaluar la actividad lipolítica cuantitativa.
- Realizar el análisis preliminar del contexto genómico del inserto de DNA metagenómico presente en el clon BAA3C3, empleando herramientas bioinformáticas.
- Identificar y caracterizar el gen responsable de la actividad lipolítica del clon BAA3C3.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Clon metagenómico BAA3C3

La recuperación del clon BAA3C3 obtenido a partir de una biblioteca metagenómica de suelo de bosque alto andino construida en trabajos anteriores se realizó a partir de los crioviales conservados en glicerol 15% a -80°C, La siembra se realizó sobre agar LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 12,5 µg/ml de tetraciclina y se llevó a incubar por 24h a 37°C (Jiménez et al 2012).

La extracción del ADN plasmídico, se realizó siguiendo el protocolo de lisis alcalina (Miniprep) (Anexo 5) descrito por Sambrook (2001) y el plásmido se transformó por electroporación en células de *Escherichia coli* XL1 Blue, utilizando los parámetros por defecto del equipo MicroPulser[®] Electroporator (Biorad, Hercules, CA, USA) empleando 10µL del plásmido recombinado y 50µL de células electrocompetentes (Anexo 6) (Jiménez et al 2012).

Con el fin de establecer un banco de trabajo, se inoculó una colonia del clon en caldo LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 12,5 µg/ml de tetraciclina y se llevó a incubar por 12 horas, 180 rpm a 37°C. El clon fue almacenado en glicerol con una concentración final del 15% a -80° C.

4.2 Evaluación de la cinética de crecimiento del clon metagenómico

Para establecer la cinética de crecimiento del clon BAA 3C3 se realizó un preinoculo a partir de una colonia en un erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de caldo LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, 12,5 µg/ml de tetraciclina, en condiciones normales de crecimiento (12 horas, 37°C, 180 rpm). Luego el preinóculo (manteniendo la relación del 10%) se adicionó en 3 erlenmeyer de 250ml conteniendo cada uno 100 ml de caldo LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, 12,5 µg/ml de tetraciclina. La absorbancia fue medida a 540 nm y ajustada a una OD de 0.08. El crecimiento se llevó a cabo durante 12 horas a 37°C y 180rpm y fue monitoreado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540nm cada hora, en un espectrofotómetro DR 5000TM. Como blanco se utilizó caldo LB y los datos obtenidos para cada una de las réplicas se promediaron para establecer la curva de crecimiento.

4.3 Confirmación de la actividad lipolítica

La actividad lipolítica del clon BAA 3C3 fue evaluada sobre medio LB (pH 7,0) emulsificado con 1% (v/v) de Tributirina, 0,01% (v/v) Tritón X-100 y suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 12,5 µg/ml de tetraciclina. Para esto se inocularon 20 µl del cultivo del clon crecido hasta una

OD₅₄₀ de 0,8 (final de la fase exponencial). Una vez colocado el inóculo sobre el medio se incubaron a 37°C por 24 horas hasta observar el crecimiento de colonias. Posteriormente se colocaron las cajas en nevera a 6°C (a bajas temperaturas se observan más fácilmente los halos) y se monitoreó diariamente hasta observar halos de hidrólisis alrededor de las colonias (Jiménez *et al* 2012). La evaluación de la actividad lipolítica sobre sustratos de cadena larga no fue evaluada debido a que estudios previos realizados por Jiménez *et al* (2012) no detectaron actividad lipolítica sobre dichos sustratos.

4.4 Determinación de la especificidad de sustrato mediante la técnica de pNP-ésteres

La evaluación cuantitativa de la actividad lipolítica del clon BAA 3C3 se realizó mediante la técnica de p-nitrofenil ésteres (pNP-éster) utilizando un lector de microplaca Anthos 2020 a una longitud de onda de 405nm (Margesin *et al* 2002; Gupta *et al* 2002; Meilleur *et al* 2009; Sifour *et al* 2010). Se realizó una curva de calibración con pNP (Sigma, Germany) utilizando concentraciones de 0,5 µM; 2,5 µM; 5 µM; 7,5 µM; 12,5 µM; 30 µM; 50 µM y 70 µM en 0,1 M de Tris-HCl pH 8,0 (Anexo 1).

Con el fin de evaluar la especificidad de sustrato, el clon BAA 3C3 se inoculó en 100 ml de caldo LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, 12,5 µg/ml de tetraciclina a partir de un preinoculo. El cultivo se incubó a 37°C y 180 rpm. La inducción del plásmido se realizó a partir de la hora 5 por un periodo de 4 horas utilizando isopropil-tio-β-D-galactosido (IPTG) a una concentración final de 0,2 mM (Kim *et al* 2004, Pardo *et al* 2006, Jiménez *et al* 2012).

Con el fin de verificar la fracción que contiene la enzima activa, se obtuvieron las fracciones: extracelular que corresponde al sobrenadante obtenido después de la centrifugación del cultivo a 10000 rpm por 7 minutos, e intracelular, obtenida mediante sonicación del *pellet* celular en hielo durante 30 minutos en presencia de 100 mM de Tris-HCl pH 8,0 y posterior centrifugación a 10000 rpm durante 7 minutos (Couto *et al* 2010; Liu *et al* 2009; Takaç & Marul 2008). El sobrenadante recuperado corresponde a la fracción intracelular.

Los sustratos lipídicos evaluados fueron pNP-Acetato (C2), pNP-Butirato (C4), pNP-Palmitato (C16) y pNP-Esterato (C18). La reacción enzimática se llevó a cabo en el equipo Bioscreen C MBR™ a 30°C por triplicado durante 2 horas para determinar la velocidad de reacción, utilizando 20 µl de las fracciones extra e intracelular del clon BAA 3C3, 180 µl de sustrato previamente emulsificado en acetonitrilo e isopropanol (C2 y C4) a una concentración final de 0,1 mM buffer de reacción (0,1 M de NaCl, 0,1 M de Tris-HCl pH 8,0 y 0,3% (v/v) de Tritón X-100), para un volumen final de 200 µl. Los blancos utilizados fueron: Blanco absoluto (Buffer de reacción), blanco de la enzima (Buffer de reacción más sustrato), blanco de las fracciones (Buffer

de reacción más fracción respectiva) y blanco de medio de cultivo (LB) (Buffer de reacción más LB). La unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ M de pNP/min bajo las condiciones de ensayo (Lee et al 2004, Shibata et al 2006, Chu et al 2008, Peng et al 2011).

4.5 Evaluación de la actividad lipolítica a diferentes temperaturas

La actividad lipolítica a diferentes temperaturas del clon BAA 3C3 se determinó con la fracción extracelular mediante la técnica de p-nitrofenil éster (pNP-éster), utilizando un lector de microplaca Anthos 2020 a 405nm. Como control negativo se utilizó *E. coli* XL1Blue. Los sustratos lipídicos empleados en este ensayo fueron pNP-Acetato (C2) y pNP-Butirato (C4). La actividad enzimática fue determinada por triplicado a 4°C, 10°C, 30°C, 37°C Y 60°C luego de 30 minutos (Jiménez *et al* 2012).

4.6 Evaluación de la actividad lipolítica a diferentes valores de pH

La actividad lipolítica a diferentes valores de pH del clon BAA 3C3 se determinó con la fracción extracelular mediante la técnica de p-nitrofenil éster (pNP-éster), utilizando un lector de microplaca Anthos 2020 a una OD405nm. Como control negativo se utilizó *E. coli* XL1Blue. Como en el caso anterior, los sustratos lipídicos empleados fueron pNP-Acetato (C2) y pNP-Butirato (C4). La reacción enzimática se llevó a cabo utilizando 20 μ l de la fracción extracelular y 180 μ l de sustrato a una concentración final de 0,1 mM utilizando los siguientes buffers: buffer 0,1 M de Glicina-HCl (pH 3), buffer 0,1 M de Acetato (pH 4 y 5), buffer 0,1 M de Fosfato (pH 6), buffer 0,1 M de Tris-HCl (pH 7 y 8) y buffer 0,1 M de Glycina-NaOH (pH 10). La actividad enzimática fue determinada por triplicado a 60°C luego de 30 minutos.

4.7 Análisis estadístico para la actividad lipolítica

Los datos obtenidos en el análisis de la actividad lipolítica se evaluaron por medio de la prueba de Shapiro-Wilk y una prueba de homogeneidad de varianzas utilizando los programas SPSS® y Statistix 9.0®.

Una vez se determinó que los datos no tenían una distribución normal, se aplicó la prueba no paramétrica de Tukey ($p \leq 0,05$), con el fin de determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (pH y Temperatura).

4.8 Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas totales de los extractos celulares fue determinada utilizando la técnica de Bradford (Bradford 1976) con el fin de obtener la actividad enzimática específica (U/mg de proteína). Para esto se realizó una curva de calibración con albúmina de suero bovino (BSA) por triplicado utilizando las siguientes concentraciones finales: 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1 mg/ml en 0,15 M de NaCl (Anexo 2). La medición se realizó a una longitud de onda de 595 nm. La reacción enzimática se llevó a cabo utilizando 20 µl del extracto crudo y 180 µl de reactivo de Bradford (8,5% de Acido fosfórico, 4,75% de etanol, 0,1 mg ml⁻¹ de Azul de Coomassie G-250) para un volumen final de 200 µl. La concentración de proteínas fue determinada a una longitud de onda de 595nm al cabo de 5 minutos a temperatura ambiente. El resultado fue expresado en mg de proteína total por mililitro.

4.9 Análisis del inserto metagenómico y búsqueda del gen lipolítico

4.9.1 Extracción del ADN plasmídico

La extracción del plásmido se realizó teniendo en cuenta la curva de crecimiento del clon, verificando que en el momento de la extracción, el clon se encontrara hacia el final de la fase exponencial, momento en el que por lo general se encuentra un mayor número de copias del plásmido (Lee *et al* 2006). Posteriormente el clon se inoculó en 10 ml de caldo LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, 12,5 µg/ml de tetraciclina y se incubó por 11 horas a 37°C y 180 rpm. El plásmido fue extraído por 2 métodos. El primero a partir de 2 ml de cultivo utilizando el kit comercial “UltraClean® Standard Mini Plasmid Prep” MOBIO Laboratories, Inc. siguiendo las instrucciones del fabricante. El segundo utilizando el protocolo de lisis alcalina (Miniprep) descrito por Sambrook (2001). Considerando que la biblioteca metagenómica se construyó en el vector *p-Bluescript II SK+* clonando el DNA metagenómico parcialmente digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *SacI* en los sitios de corte correspondientes (Montaña *et al* 2012), estas enzimas fueron utilizadas para liberar el inserto del plásmido recuperado. Para esto se realizó una digestión del plásmido recombinado utilizando una concentración final de 1,5 U de las enzimas *KpnI* y *SacI* por cada µg de ADN a 37°C durante 3 horas. La extracción y digestión del plásmido y el inserto metagenómico se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1%; TAE 1X y fue visualizado en un documentador de geles BIO-RAD®. El tamaño del plásmido y del inserto fue estimado por comparación visual con el marcador de peso molecular 1 Kb ladder (Promega®). Una vez se obtuvo el plásmido se determinó la concentración de ADN en ng/µL y la pureza por la relación de absorbancia 260/280 empleando el equipo NanoDrop™ 1000 Thermo Scientific.

4.9.2 Secuenciación y búsqueda de ORFs

La secuenciación del inserto metagenómico se realizó en MACROGEN (Seúl, Korea) por el método de *genwalking*. Para la primera ronda de secuenciación se emplearon los iniciadores universales T7promoter y T3promoter. Posteriormente se diseñaron iniciadores internos y se realizaron 5 rondas de secuenciación adicionales hasta obtener el *contig* completo.

La búsqueda de ORFs en los seis marcos de lectura se realizó utilizando los programas que se muestran en la **Tabla 4**. Se seleccionaron aquellos ORFs que tenían un tamaño superior a 50 codones y un referente significativo en las bases de datos (Liu *et al* 2009). El porcentaje de GC del inserto metagenómico y de los ORFs se determinó usando el programa Star ORF (**Tabla 4**).

Tabla 4. Programas bioinformáticos utilizados para la búsqueda de ORFs y determinación del porcentaje guanina-citosina en la secuencia metagenómica. Fuente: Autor

Función	Programa	Link
Búsqueda de ORFs	ORF-finder	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/
	ORF-finder	http://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html
%GC	Star ORF	http://star.mit.edu/orf/index.html?gclid=CNmbluWz37cCFYVZ7AodR1QAmg

4.9.3 Análisis de ORFs y búsqueda motivos

Los ORFs predichos fueron analizados utilizando el programa BLASTP frente a las bases de datos NCBI-NR, Lipase Engineering Database y Esther Database (Altschul *et al* 1997, Fisher y Pleiss 2003, Hotelier *et al* 2004, Heath *et al* 2009, Couto *et al* 2010) (**Tabla 5**). La búsqueda de promotores se realizó mediante los programas descritos en la **Tabla 5**, Las secuencias Shine-Dalgarno o RBS (Ribosome Binding Site) y secuencias terminadoras se buscaron manualmente utilizando el programa MEGA 5.2. La búsqueda de motivos (G(A)-X_{aa}-S-X_{aa}-G y HG) y de aminoácidos que podrían estar involucrados en la triada catalítica, característica de las enzimas lipolíticas, se llevó a cabo con este programa teniendo en cuenta las distancias entre aminoácidos reportadas por Jiménez *et al* (2012).

Tabla 5. Programas y bases de datos utilizadas para el análisis de ORFs. Fuente: Autor.

Función	Programa	Link
Búsqueda de promotores	Promoter prediction	http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html
	BPROM	http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb
Cálculo de peso molecular, pI y % a.a.	ProtParam	http://web.expasy.org/protparam/
		http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins
Bases de datos	BLASTP	http://bioweb.ensam.inra.fr/ESTHER/general?what=index
		http://www.led.uni-stuttgart.de/
Búsqueda (RBS y Pribnow)	MEGA 5,2	http://www.megasoftware.net/megamac.php

4.9.4 Relación entre la secuencia del ORF 1 y las familias de enzimas lipolíticas

Con el fin de determinar si existe una relación entre la secuencia del ORF 1 (posible carboxilesterasa) y las esterases/lipasas reportadas por Chu *et al* (2008), que incluye representantes de las 8 familias descritas por Arpingy y Jaeger (1999), se construyó un árbol de distancias. El alineamiento múltiple de las secuencias y la construcción del árbol se realizó con el programa CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) utilizando los parámetros por defecto.

4.9.5 Comparación de los ORFs 1, 4 y 5 con la esterasa del clon BAA 3G2

Finalmente y con el objetivo de establecer si alguno de los ORF predichos en el inserto metagenómico del clon BAA 3C3 presentaba alguna similitud con la esterasa identificada previamente por Jiménez y colaboradores en 2012, se realizó un alineamiento pareado entre los ORFs identificados en este trabajo, que pudieran estar involucrados con la actividad lipolítica, y la secuencia de la esterasa identificada en el clon BAA 3G2, mediante el programa CLUSTALW2 utilizando los parámetros por defecto.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Confirmación de la actividad lipolítica

Utilizando el clon re transformado en XL1 Blue (BAA 3C3), se confirmó la actividad lipolítica en Tributirina como sustrato. Luego de 10 días se observaron halos de aclaramiento causados por la hidrólisis de la Tributirina indicando la presencia de esterases o lipasas Gupta *et al* (2003), siendo evidentes para el día 15, momento en el cual los halos presentaron diámetros entre 2mm y 3mm (Figura 4).

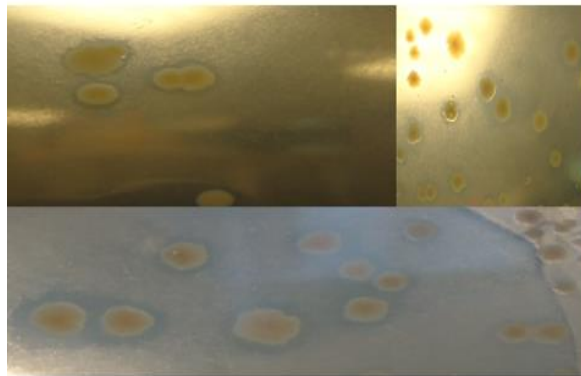


Fig. 4. Halos de hidrólisis generados por el clon BAA 3C3 correspondientes al día 15 en agar LB suplementado con Tributirina 1% (v/v), Tritón X-100 0,01% (v/v), 100 µg/ml de ampicilina y 12,5 µg/ml de tetraciclina. Fuente: Autor.

5.2 Cinética de crecimiento del Clon BAA 3C3

La cinética de crecimiento del clon BAA 3C3 se llevó a cabo con el fin de determinar el comportamiento y las fases de crecimiento del clon, ya que estas pueden verse afectadas por la presencia del plásmido o del inserto metagenómico debido a las altas tasas de expresión heteróloga que generan toxicidad (Ferrer *et al* 2005), por la alteración del metabolismo y fisiología del hospedero y por la presencia de antibióticos (Glick 1995), entre otras. El objetivo de la cinética fue establecer el momento adecuado para realizar la inducción del plásmido con IPTG. Hansen y colaboradores (2007) afirman que el IPTG es comúnmente usado en los sistemas que utilizan promotores *lac* y además tiene la ventaja de ser incorporado a la célula con ayuda de la lactosa permeasa. Bajo las condiciones empleadas en este trabajo, la fase de exponencial de crecimiento del clon BAA 3C3 se observó entre la hora 1 y 8, y la fase estacionaria inició alrededor de la hora 9 (Figura 5). La concentración de proteínas totales luego de la inducción con IPTG fue de 0,031 mg/ml.

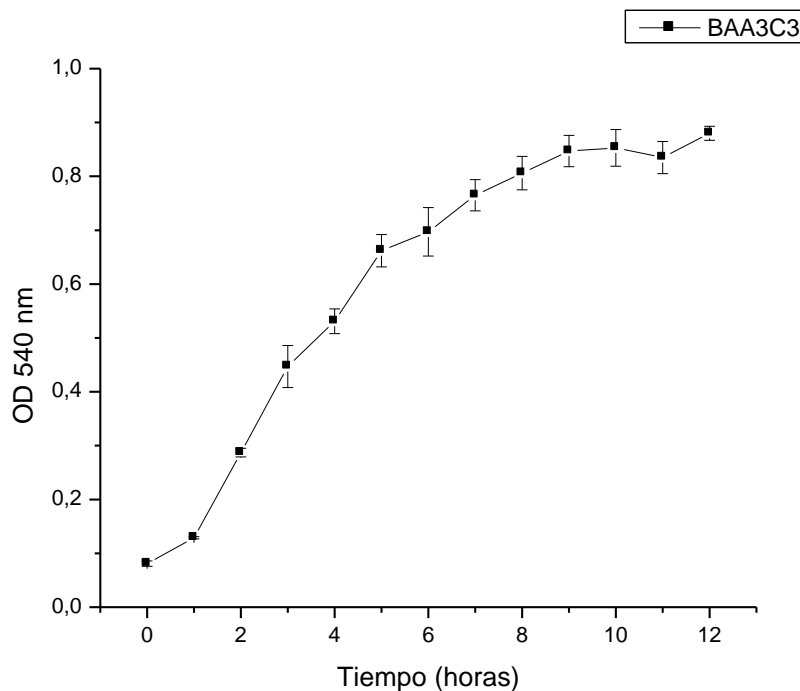


Fig. 5. Cinética de crecimiento del clon BAA 3C3. Fuente: Autor.

5.3 Evaluación cuantitativa de la actividad lipolítica mediante la técnica de pNP-Ésteres

5.3.1 Determinación de la capacidad de hidrólisis sobre diferentes sustratos

El análisis de la actividad lipolítica mediante la técnica de pNP-Esteres mostró que la enzima lipolítica del clon BAA 3C3 fue capaz de hidrolizar tanto el pNP-Acetato como el pNP-Butirato (sustratos de cadena corta) (**Figura 6** y **Figura 7**), sin embargo no presentó mayor actividad en pNP-Palmitato y pNP-Esterato (sustratos de cadena larga) (**Figura 6**); lo que coincide con lo reportado por Jiménez *et al* 2012 quienes se refieren a la capacidad de la enzima lipolítica del clon BAA 3C3 para hidrolizar la tributirina (sustrato lipídico de cadena corta) y la incapacidad para hidrolizar el aceite de oliva (sustratos lipídicos de cadena larga). Peng *et al* (2011) y Ping *et al* (2012) hacen referencia a que las lipasas (EC 3.1.1.3) tienen una preferencia por acilglicéridos o acilglicérols de cadena larga mientras que las esterases (EC. 3.1.1.1) tienen mayor afinidad por los acilglicérols de cadena corta, por lo que se sugiere que la enzima lipolítica del clon BAA 3C3 es una esterasa (EC. 3.1.1.1). Además la enzima lipolítica del clon BAA 3C3 también mostró características similares a las reportadas por Jiang *et al* (2012) para una esterasa obtenida a partir de un metagenoma de sedimentos de aguas profundas, debido a que ésta también tuvo preferencia por sustratos lipídicos de cadena corta especialmente pNP-Acetato y pNP-Butirato (actividad relativa del 70 y 100% respectivamente).

Cabe mencionar que los resultados obtenidos empleando acetonitrilo como diluyente de los sustratos lipídicos no fueron los mejores, debido a la autohidrólisis del sustrato y a la variación en los resultados. Por lo anterior, se empleó el isopropanol como diluyente en posteriores ensayos ya que éste mostró mejores resultados. Trabajos realizados por Kanjanavas *et al* (2010) relacionados con la purificación y caracterización de lipasas tolerantes a solventes orgánicos y detergentes mostraron que el uso de isopropanol como diluyente es adecuado para evaluar la actividad enzimática.

La comparación entre los datos obtenidos a partir de las fracciones intra y extracelular del clon BAA 3C3 permitió establecer que la enzima lipolítica se encuentra presente en la fracción extracelular (datos no mostrados). Jaeger y Egger (2002) mencionan que la mayoría de lipasas bacterianas son secretadas al medio extracelular por su capacidad de translocación a través de la membrana mediante tres rutas distintas: el sistema Sec-Xcp, el sistema Tat y el sistema ABC; los cuales difieren en el tipo de proteínas transportadoras, en el péptido señal y en los motivos característicos de las enzimas lipolíticas.

La medición de las micromoles de pNP liberadas en pNP acetato y pNP butirato utilizando como diluyente isopropanol para los ensayos de temperatura y pH se realizó luego de 30 minutos (Tiempo en el cual la reacción enzimática ya había iniciado), para lo cual se tuvo en cuenta la curva de actividad lipolítica en función del tiempo sobre pNP-Acetato y pNP-Butirato (**Figura 7**).

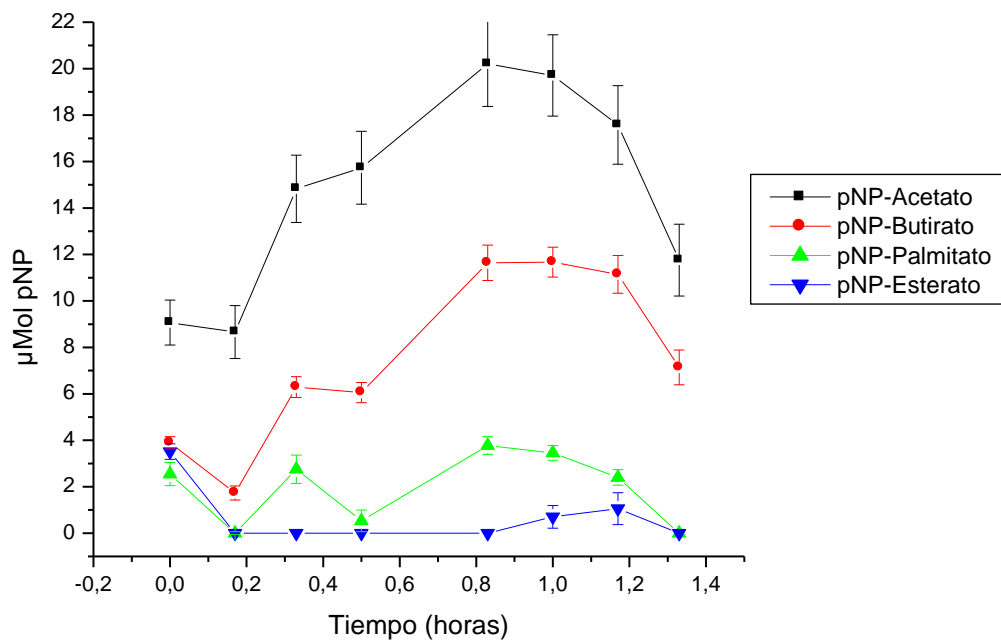


Fig. 6. Actividad lipolítica del clon BAA 3C3 sobre diferentes sustratos lipídicos empleando como diluyente acetonitrilo. Fuente: Autor.

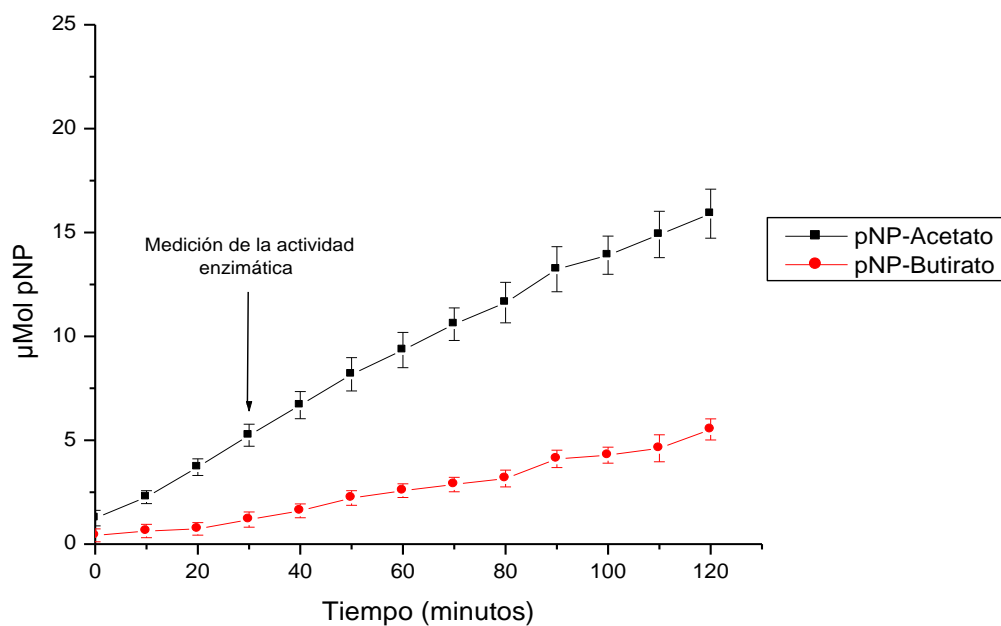


Fig. 7. Actividad lipolítica del clon BAA 3C3 sobre pNP-Acetato y pNP-Butirato empleando como diluyente isopropanol. Fuente: Autor.

5.3.2 Evaluación de la actividad lipolítica a diferentes temperaturas

La enzima producida por el clon BAA 3C3 presentó la mayor actividad específica a 60°C, tanto en pNP-Butirato (1,59 U/mg +/-0,375) (**Figura 8**) como en pNP-Acetato (2,56 U/mg +/-0,482) (**Figura 9**); razón por la cual fueron seleccionados estos valores como el 100% de la actividad relativa en cada caso. Sin embargo, no se observaron valores de actividad detectable a 4°C para pNP-Acetato y a 4°C y 30°C para pNP-Butirato. La estabilidad de la enzima a 60°C contrasta con lo reportado por Ping *et al* (2012) para una esterasa purificada, obtenida de un metagenoma de suelo del desierto antártico, la cual mostró una disminución de aproximadamente el 40% en relación a la máxima actividad detectada. De manera similar Kumar *et al* (2013) mencionan la inestabilidad a 60°C de una lipasa mutada y purificada obtenida del suelo de aguas termales en Tattapani. Así mismo autores como Yamaguchi *et al* (1996) y Han *et al* (2009) mencionan que la termoestabilidad de la enzima depende de la presencia y longitud de enlaces disulfuro. Cabe mencionar que otros estudios como los realizados por Jeon *et al* (2009) y Heath *et al* (2009) muestran que esterasas aisladas de ambientes con bajas temperaturas pueden tener una alta actividad enzimática a temperaturas superiores a las del sitio de muestreo, al igual que lo observado en este estudio.

De otra parte, varios autores han reportado valores diferentes de estabilidad en lipasas provenientes de metagenomas a diferentes temperaturas, para una esterasa purificada obtenida de un metagenoma de sedimentos de aguas profundas Jiang *et al* (2012) reportaron una estabilidad del 100% a 20°C en pNP-Butirato, por otra parte estudios realizados por Peng *et al* (2011) mostraron para una esterasa purificada de un metagenoma de sedimentos neríticos del Mar del Sur de China una estabilidad del 100% a 40°C en pNP-Butirato. Adicionalmente Berlemont *et al* (2013) reportan una actividad relativa del 100% en un rango entre los 38°C y 45° C en pNP-Butirato, a partir de una esterasa purificada obtenida de un metagenoma de suelo de bosque templado.

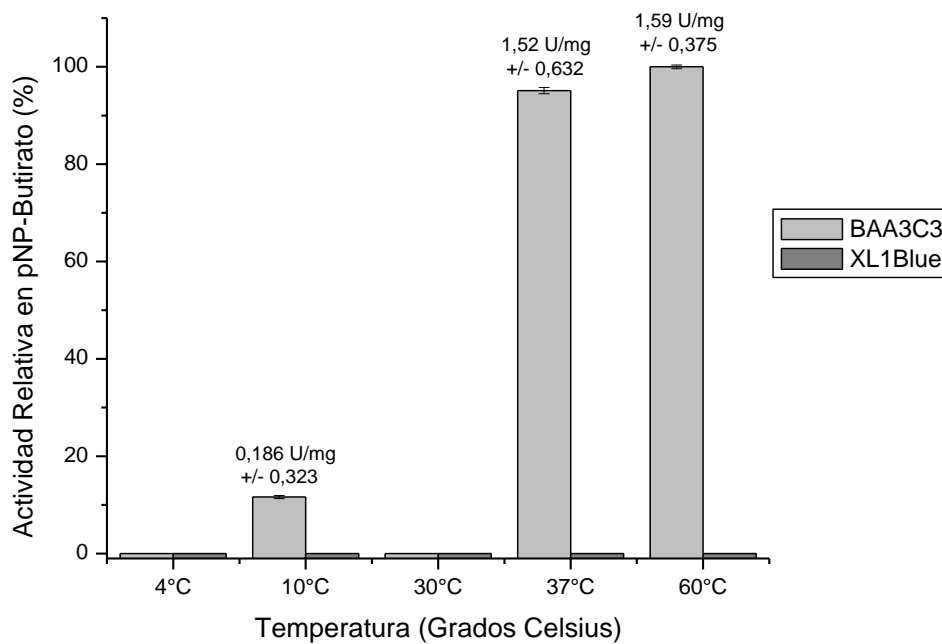


Fig. 8. Cuantificación de la actividad lipolítica del clon BAA 3C3 a diferentes temperaturas en pNP-Butirato. Fuente: Autor.

Por otro lado autores como Luo *et al* (2012) han obtenido una estabilidad del 100% a 50°C en pNP-Acetato para una esterasa purificada de *Fusarium* sp. derivada de un metagenoma de sedimentos costeros, algo similar se observó para una esterasa purificada obtenida de *Pseudomonas mandelii*, la cual mostró una estabilidad del 100% a 40°C en pNP-Acetato (Hong *et al* 2012). De la misma manera Sumby *et al* (2009) reportan una actividad relativa del 100% a 40°C a partir de una esterasa purificada obtenida de *Oenococcus oeni*. Así mismo Asoodeh *et al* (2013) y Chandrasekaran *et al* (2011) obtuvieron actividades relativas del 100% a 50°C a partir de esterases purificadas producidas por *Bacillus subtilis* DR8806 y *Sparassis crispa* respectivamente.

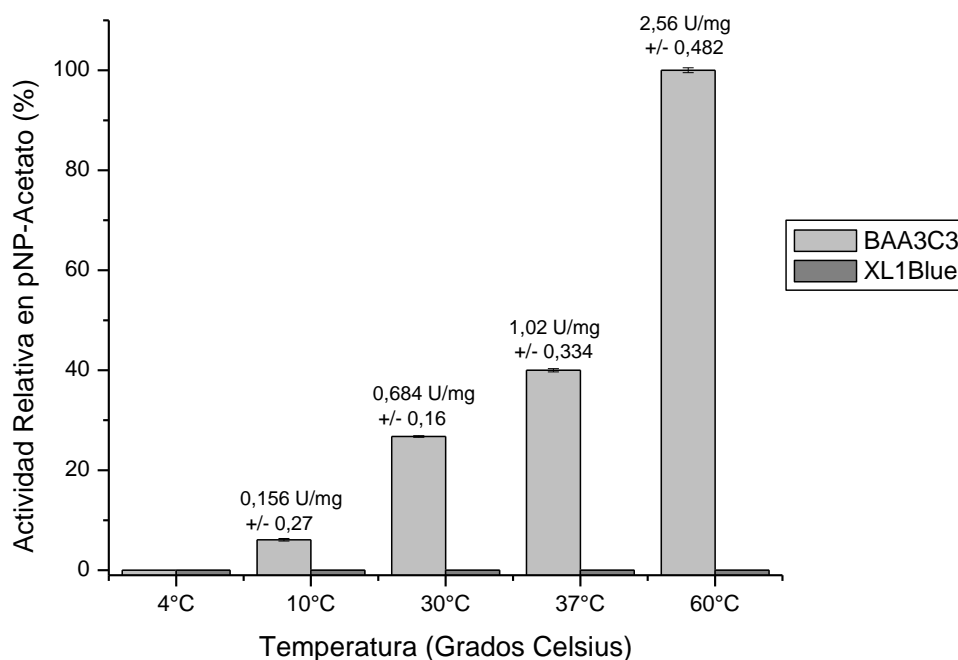


Fig. 9. Cuantificación de la actividad lipolítica del clon BAA 3C3 a diferentes temperaturas en pNP-Acetato. Fuente: Autor.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se puede sugerir que la enzima lipolítica presente en el clon BAA 3C3 es estable en altas temperaturas (**Figura 8 y Figura 9**). El análisis estadístico mostró que los datos de temperatura no seguían una distribución normal ni una homogeneidad de varianzas (prueba de Shapiro-Wilk y test de homogeneidad de varianzas). Razón por la que se llevó a cabo la prueba de Tukey la cual mostró que no había diferencias estadísticamente significativas entre las temperaturas de 60°C y 37°C, pero que sí existían diferencias estadísticamente significativas entre 60°C y las demás temperaturas (4°C, 10°C y 30°C) para ambos sustratos (Anexo 3).

5.3.3 Evaluación de la actividad lipolítica a diferentes pH

La enzima producida por el clon BAA 3C3 presentó la mayor actividad específica a pH 7, tanto en pNP-Butirato (5,48 U/mg +/-0,351) (**Figura 10**) como en pNP-Acetato (6,97 U/mg +/- 0,141) (**Figura 11**); razón por la cual fueron seleccionados estos valores como el 100% de la actividad relativa en cada caso. Sin embargo, no se observaron valores de actividad detectable a pH 3,4,5 y 10 tanto para pNP-Acetato como para pNP-Butirato. Arzeta (2009) menciona que la estabilidad energética depende de las interacciones no covalentes débilmente polares como las fuerzas de Van der Waals o los puentes de hidrogeno, mientras que la estabilidad estructural

depende de las interacciones hidrofóbicas entre aminoácidos no polares y las moléculas de agua, factores que pueden variar en función del pH.

Varios autores han reportado una actividad relativa del 100% en pNP-Butirato para esterasas provenientes de diferentes metagenomas en diferentes valores de pH: a pH 7,5 (Jiang *et al* 2012), a pH 8,57 (Peng *et al* 2011), a pH 6,5 (Berlemont *et al* 2013) y a pH 8 (Navarro 2012). Esto puede ser útil, ya que industrias como la de lácteos o detergentes pueden requerir enzimas que funcionen a valores de pH neutro o ligeramente alcalino Kemppler (1983), Vulfson *et al* (1994) y Hasan *et al* (2006).

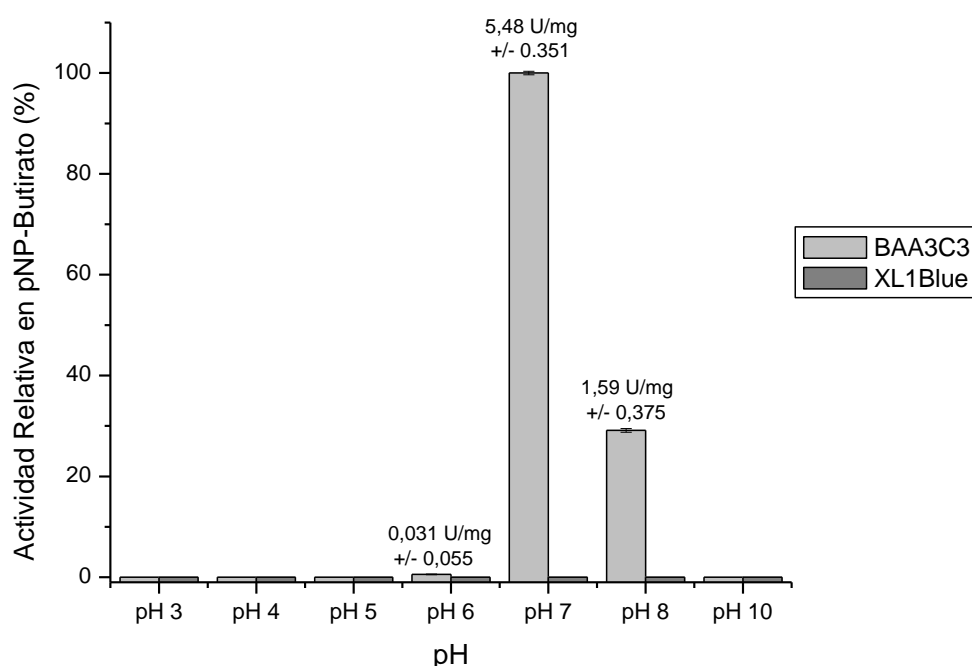


Fig. 10. Cuantificación de la actividad lipolítica del clon BAA 3C3 a diferentes valores de pH en pNP-Butirato. Fuente: Autor.

En el caso de actividad sobre pNP-Acetato, se han descrito actividades relativas del 100% a pH 8,5 (Hong *et al* 2012), a pH 5 (Sumbly *et al* 2009) y a pH 8 (Asoodeh *et al* 2013, Chandrasekaran *et al* 2011, Luo *et al* 2012). Estos trabajos muestran que las esterasas provenientes de diferentes ambientes presentan actividad óptima en diferentes valores de pH. Sin embargo Abbai (2011) menciona que la mayoría de las enzimas lipolíticas son funcionales a pH alcalino, lo que podría relacionarse con la estabilidad a pH 8 de la enzima lipolítica evaluada en este estudio.

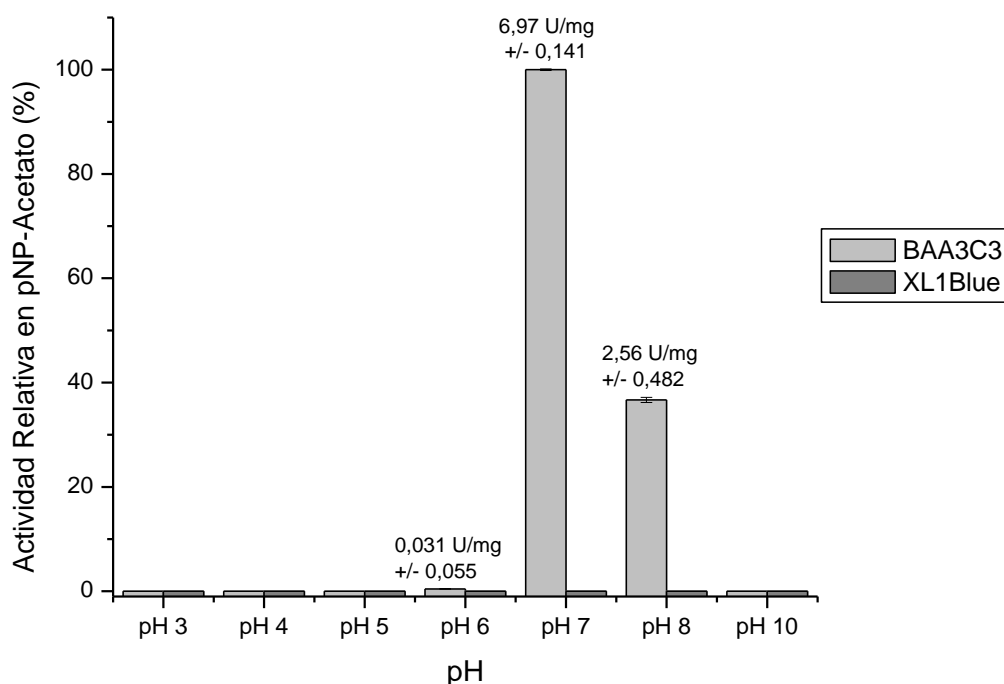


Fig. 11. Cuantificación de la actividad lipolítica del clon BAA 3C3 a diferentes valores de pH en pNP-Acetato. Fuente: Autor.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se puede sugerir que la enzima lipolítica presente en el clon BAA 3C3 es estable en pH neutro y ligeramente alcalino (**Figura 10** y **Figura 11**). El análisis estadístico mostró que los datos de pH no seguían una distribución normal ni una homogeneidad de varianzas (prueba de Shapiro-Wilk y test de homogeneidad de varianzas). Razón por la que se llevó a cabo la prueba de Tukey la cual mostró que había una diferencia estadísticamente significativa entre pH 7 y el resto de valores de pH evaluados, para ambos sustratos (Anexo 4).

5.4 Caracterización inicial del inserto metagenómico y análisis bioinformático

5.4.1 Determinación del tamaño del inserto metagenómico

Una vez extraído y purificado el plásmido recombinado del clon BAA 3C3, su concentración y pureza se determinó utilizando el equipo NanoDrop™ 1000 Thermo Scientific y el tamaño del inserto metagenómico se determinó después de la digestión con las enzimas de restricción *KpnI* y *SacI* y posterior separación de los productos de digestión por electroforesis en gel de agarosa (1%). La concentración promedio de ADN plasmídico obtenido fue 610 ng/μl con una relación de absorbancia 260/280 de 1,95, lo que indica una adecuada calidad y pureza del ADN plasmídico.

El tamaño estimado para el inserto metagenómico, con base en el análisis de restricción se encontró entre 4,5-5 Kb (Figura 12) y es consistente con el tamaño promedio calculado por Jiménez et al (2012) y Montaña et al (2012) para los clones de la librería metagenómica obtenida del suelo de bosque alto andino.

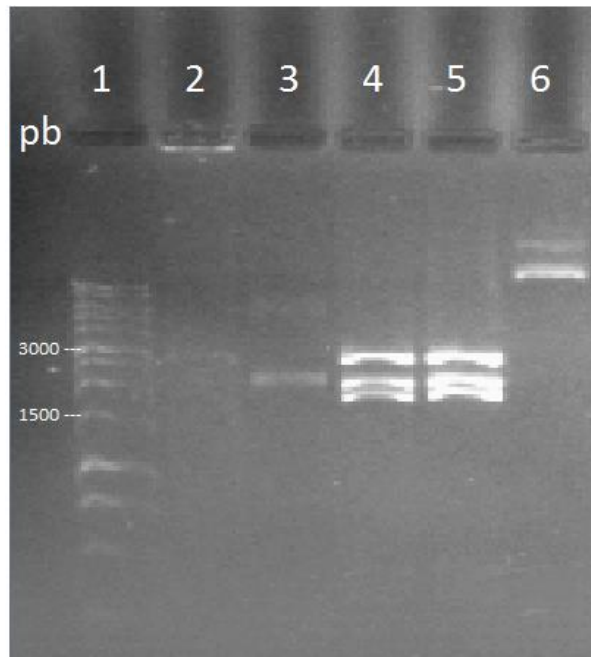


Fig. 12. ADN plasmídico del clon BAA 3C3 digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *SacI* La banda superior corresponde al vector linealizado (3000 pb) y las otras dos bandas corresponden al inserto metagenómico digerido por cualquiera de las enzimas [4][5]. Marcador de peso molecular 1Kb [1]. Plásmido sin digerir [3]. Fuente: Autor.

Una vez obtenida la secuencia del inserto metagenómico fue posible calcular el tamaño exacto del inserto que correspondió a 4899pb con un porcentaje de guanina citosina del 67%. Esto coincide con los resultados obtenidos mediante el análisis de restricción (**Figura 12**).

5.4.2 Búsqueda de ORFs

Empleando el programa ORF finder del NCBI se detectaron 41 ORFs y utilizando el programa ORF finder de Bioinformatics Organization se detectaron 45 ORFs lo que se atribuye a los parámetros utilizados por cada programa (Codones de inicio, longitud de los ORFs, etc.). Sin embargo para la construcción del contexto genómico se tuvieron en cuenta solo aquellos ORFs mayores a 50 codones y con algún referente significativo en las bases de datos (**Tabla 6** y **Tabla 7**). Utilizando la base de datos Lipase Engineering Database solo se obtuvo un resultado con el ORF 2 y no fue significativo en comparación con las otras bases de datos. Los resultados obtenidos mostraron que la mayoría de ORFs predichos se encuentran asociados a

microorganismos de los filums Proteobacteria y Actinobacteria. Filums que también se habían asociado a varios de los clones obtenidos a partir de la librería metagenómica de suelo de bosque alto andino en trabajos previos (Montaña *et al* 2011, Jiménez *et al* 2012). De igual manera otros autores como Couto *et al.* (2010), DeAngelis *et al.* (2010) y Fierer *et al* (2012) también asocian estos filum a estudios metagenómicos de diferentes ambientes dentro de los que se encuentra el suelo.

Tabla 6. ORFs mayores a 50 aminoácidos y con algún referente significativo en la base de datos NCBI-NR utilizando BLASTP. Fuente: Autor.

ORF	Frame	NCBI-NR				
		Mejor match	Microorganismo asociado	E-value	Score (bits)	Identidad
1 (272 aa)	+2	-	-	-	-	-
2 (321 aa)	+2	Metiltransferasa putativa (WP_006337267.1)	<i>Mesorhizobium sp.</i> (Alfaproteobacteria)	3E-45	165	106/266 (40%)
3 (447 aa)	+3	Acil-CoA deshidrogenasa (YP_076306.1)	<i>Symbiobacterium thermophilum</i> (Firmicutes)	3E-52	191	141/370 (38%)
4 (342 aa)	-2	Proteína predicha (WP_009077389.1)	<i>Streptomyces sp.</i> (Actinobacteria)	1E-04	50,4	40/118 (34%)
5 (222 aa)	-2	Regulador transcripcional (YP_007046688.1)	<i>Cyanobium gracile</i> (Cyanobacteria)	2E-68	220	109/215 (51%)

Tabla 7. ORFs mayores a 50 aminoácidos y con algún referente significativo en la base de datos Esther Database utilizando BLASTP. Fuente: Autor.

ORF	Frame	Esther Database				
		Mejor match	Microorganismo asociado	E-value	Score (bits)	Identidad
1 (272 aa)	+2	Carboxilesterasa (9acto-d5zpa3)	<i>Streptomyces ghanaensis</i> ATCC 14672 (Actinobacteria)	8E-07	50,8	74/236 (31 %)
2 (321 aa)	+2	α/β hidrolasa (psepw-b1j2v7)	<i>Pseudomonas putida</i> (Gamaproteobacteria)	0,17	33,5	27/73 (36%)
3 (447 aa)	+3	Haloperoxidasa (azoc5-a8i8u0)	<i>Azorhizobium caulinodans</i> ATCC 43989 (Alfaproteobacteria)	0,16	34,3	30/96 (31%)
4 (342 aa)	-2	Cutinasa (Proteína hipotética) (nocfa-q5yn12)	<i>Nocardia farcinica</i> (Actinobacteria)	7E-06	48,1	32/82 (39%)
5 (222 aa)	-2	Homoserina transacetilasa (ralme-q1le44)	<i>Ralstonia metallidurans</i> ATCC 43123 (Betaproteobacteria)	3,3	28,5	19/67 (28%)

Van elsas *et al* (2007) y Jiménez *et al* (2012) mencionan que la comunidad microbiana del suelo de bosque la componen en gran medida bacterias de los filum Proteobacteria (subclases α , β , γ), Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Acidobacteria, así como también una gran proporción de hongos (Hawksworth 2001), que participan en la solubilización del fósforo (Useche *et al* 2004), en la fijación del nitrógeno (Albino *et al* 2006), en la producción de sustancias asociadas al crecimiento vegetal (Torres *et al* 2000), en la degradación de celulosa (Ulrich *et al* 2008), entre otras.

Por último cabe mencionar que se han encontrado reportes de enzimas lipolíticas a partir de géneros como los asociados a los ORFs en la **Tabla 6** y la **Tabla 7**. Por ejemplo se han encontrado esterases y lipasas en *Streptomyces coelicolor* (Bielen *et al* 2009), *Streptomyces griseus* (Vishnupriya *et al* 2010), y *Streptomyces exfoliates* (Aly *et al* 2012); lipasas extracelulares en *Pseudomonas aeruginosa* (Peng *et al* 2010) y en *Pseudomonas gessardii* (Ramani *et al* 2010), una

triacilglicerol lipasa en *Pseudomonas cepacia* (Chen *et al* 2011), una lipasa con potencial aplicación en la industria de biodiesel en *Ralstonia* spp. (Yoo *et al* 2011), una lipasa extracelular en *Ralstonia eutropha* (Lu *et al* 2013) y una esterasa de *Symbiobacterium thermophilum* (Fersini *et al* 2012) aislada de una librería metagenómica.

5.4.3 Búsqueda de regiones promotoras y construcción del contexto genómico

La búsqueda de regiones promotoras para los ORFs predichos utilizando los programas Promoter prediction y BPROM mostraron una posible región promotora para el ORF 2 (Datos no presentados), mientras que la búsqueda de posibles secuencias Shine-Dalgarno y posibles cajas Pribnow mediante el programa MEGA 5.2 permitió obtener una mayor cantidad de asociaciones basados en la distancia al codón de inicio y en los nucleótidos descritos por Shine y Dalgarno (1975) y Pribnow (1975) (**Tabla 8**), lo que podría sugerir que la expresión de algunas de las enzimas codificadas por estos ORFs está regulada por su propio promotor.

Tabla 8. Posibles secuencias Shine-Dalgarno y posibles cajas Pribnow de los ORFs predichos. Fuente: Autor.

ORF	Frame	Posible secuencia Shine-Dalgarno	Distancia al ORF	Posible caja Pribnow	Distancia al ORF
1 (272 aa)	+2	GGTGA	3pb	-	-
		GACGG	6 pb	-	-
2 (321 aa)	+2	GGTGA	6pb	ATATT	23pb
3 (447 aa)	+3	CGAGG	12pb	AGATA	32pb
4 (342 aa)	-2	CGAGT	11pb	-	-
5 (222 aa)	-2	GGTGG	11pb	TTGA	32pb

En la construcción del contexto genómico utilizando el frame +2 se ubicó el ORF 1 (Carboxilesterasa) entre los nucleótidos 1514 y 2332 de la secuencia metagenómica (**Figura 13**), adyacente a este se ubicó el ORF 2 (Metiltransferasa) entre los nucleótidos 2402 y 3367 (**Figura 13**). Existen reportes que mencionan la presencia de metiltransferasas y carboxilesterasas contiguas dentro de un mismo contexto genómico (**Tabla 9**). De igual manera en el *frame* +3 se encontró el ORF 3 (Acil-CoA deshidrogenasa) entre los nucleótidos 894 y 2237 (**Figura 13**). El ORF 4 (Cutinasa) se localizó en la hebra complementaria en el *frame* -2 entre los nucleótidos 38 y 1066 mientras que el ORF 5 se ubicó cerca al final de la hebra complementaria entre los nucleótidos 3896 y 4564 (**Figura 13**).

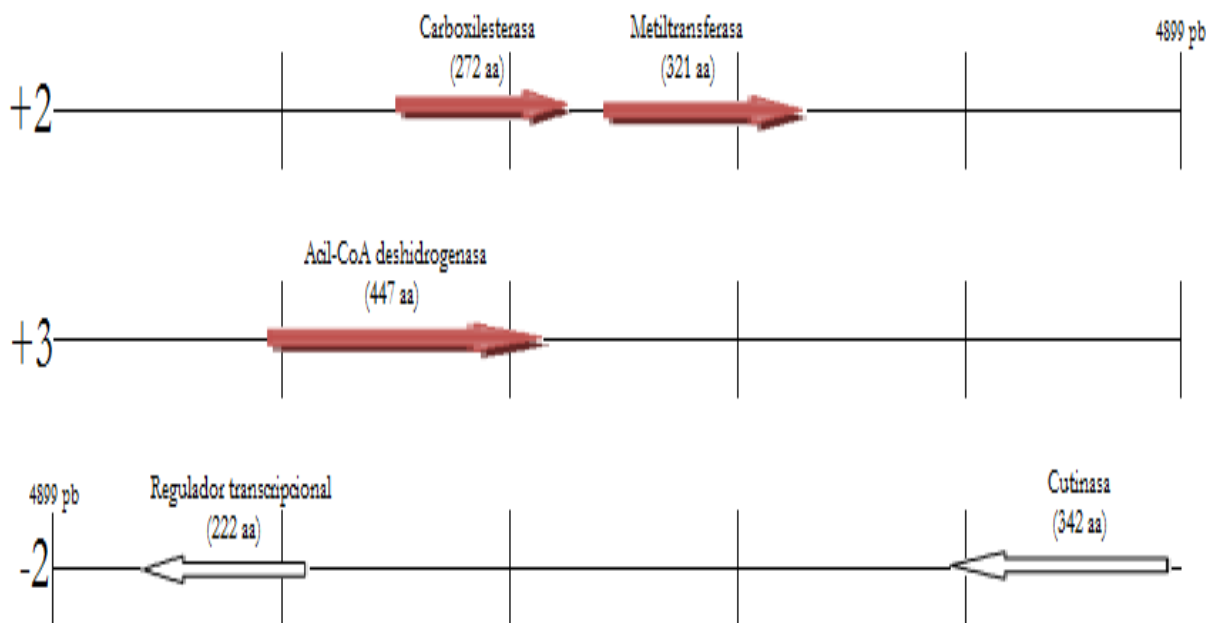


Fig. 13. Contexto genómico probable del inserto metagenómico del clon BAA 3C3. En la parte izquierda se indican los *frames*. Las flechas indican los ORFs predichos y su ubicación dentro de la secuencia. Fuente: Autor.

La **Tabla 9** muestra algunos contextos genómicos que involucran enzimas similares a las predichas en los ORFs de este estudio, a partir de algunos microorganismos pertenecientes a los filum Actinobacteria y Proteobacteria.

5.4.4 Búsqueda de motivos

El ORF 4 fue asociado mediante la base de datos Esther Database a una cutinasa. Castro et al (2010) mencionan que las cutinasas (EC 3.1.1.74) poseen características similares a esterasas y lipasas, como por ejemplo la capacidad de hidrolizar ésteres solubles y triacilgliceroles o la presencia de la triada catalítica (Ser 120, Asp175 e His188), razón por la cual se tuvo en cuenta el ORF 4 para la búsqueda de motivos conservados (involucrados en la estabilidad del residuo nucleófilo) y aminoácidos asociados pertenecientes a la triada catalítica (Uppenberg et al 1994) (Tabla 10).

Tabla 9. Contextos genómicos similares a los obtenidos en este trabajo. Fuente: Autor.

Cutinasa	Deshidrogenasa	Esterasa	Metiltransferasa	Regulador transcripcional	Microorganismo	Referencia
-	Aldehído deshidrogenasa	-	Metiltransferasa	Regulador transcripcional	<i>Streptomyces flavogriseus</i> ATCC 33331 (Actinobacteria)	Lucas <i>et al</i> (2012a)
-	Alcohol deshidrogenasa	-	Homocisteína S-metiltransferasa	Regulador transcripcional	<i>Streptomyces violaceusniger</i> (Actinobacteria)	Lucas <i>et al</i> (2012b)
-	Acil-CoA deshidrogenasa	-	Metiltransferasa	Regulador transcripcional	<i>Burkholderia cepacia</i> (Betaproteobacteria)	Hong <i>et al</i> (2012 a)
-	3-Isopropilmalato deshidrogenasa	-	Metiltransferasa	Regulador transcripcional	<i>Cyanothece</i> sp. (Cyanobacteria)	Lucas <i>et al</i> (2013)
-	Acil-CoA deshidrogenasa	Esterasa	-	-	<i>Burkholderia cepacia</i> (Betaproteobacteria)	Hong <i>et al</i> (2012 b)
Cutinasa	Colin deshidrogenasa	-	-	-	<i>Aspergillus fumigatus</i> (Fungi)	Nierman <i>et al</i> (2005)
-	Acil-CoA deshidrogenasa	-	Metiltransferasa	-	<i>Streptomyces violaceusniger</i> (Actinobacteria)	Lucas <i>et al</i> (2012c)
-	Acil-CoA deshidrogenasa	-	-	Regulador transcripcional	<i>Streptomyces griseus</i> (Actinobacteria)	Ohnishi <i>et al</i> (2012)
-	-	Carboxilesterasa	Metiltransferasa	-	<i>Listeria monocytogenes</i> (Firmicutes)	McMullen <i>et al</i> (2013)
-	-	Carboxilesterasa	Metiltransferasa	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Actinobacteria)	Lew <i>et al</i> (2013)

El análisis contra la base de datos NCBI-NR mostró que el ORF 5 estaba asociado a un regulador transcripcional de *Cyanobium gracile*. Teniendo en cuenta que la esterasa del clon BAA 3G2 obtenida a partir de la misma librería metagenómica presentaba cierta similitud con reguladores transcripcionales de actinobacterias (Jiménez *et al* 2012), también se buscaron posibles motivos conservados y aminoácidos característicos de lipasas y esterases (**Tabla 10**).

Como el ORF 1 se encontró asociado a una carboxilesteraza incluida en la base de datos Esther Database, también fue seleccionado para la búsqueda de motivos relacionados con lipasas y esterases (**Tabla 10**).

La presencia del pentapeptido (G(A)-X_{aa}-S-X_{aa}-G) característico de la gran mayoría de lipasas no se evidenció en los ORFs 1,4 y 5. Sin embargo, en estudios de mutagénesis dirigida de una esterasa de *Burkholderia gladioli* mostraron que el motivo G(A)-X_{aa}-S-X_{aa}-G no siempre juega un papel importante en la función de esta enzima (Petersen *et al* 2001).

Por otro lado, autores como Derewenda *et al* (1994) y Gonzales *et al* (2010) mencionan que solo la histidina está completamente conservada en la tríada catalítica, la cual plantean tiene una estructura general nucleófilo-ácido-histidina.

Tabla 10. Posibles motivos y aminoácidos basados en distancia que podrían estar asociados a la tríada catalítica (S, D, H) y al hoyo oxianión. S (Serina catalítica). Fuente: Autor.

ORF	Frame	Motivo S-X-G	Posición en el ORF	Motivo HG	Posición en el ORF	Ubicación Aspartato	Ubicación Histidina
1 (272 aa)	+2	LA <u>S</u> PG	11-15 aa	-	-	131, 133, 136, 146, 148	180, 184, 194
		RG <u>S</u> SG	163-167 aa	HGRG	100-103 aa	-	254
4 (342 aa)	-2	TV <u>S</u> DG	150-154 aa	HGAG	37-40 aa	258, 262, 284, 286	316, 340
5 (222 aa)	-2	RI <u>S</u> RG	48-52 aa	HG	37-38 aa	164, 170, 186, 190	-

5.5 Árbol de distancias y comparación de secuencias con la esterasa del clon BAA 3G2

Teniendo en cuenta el contexto genómico y la posible presencia de aminoácidos involucrados en la tríada catalítica se seleccionó la proteína codificada por el ORF 1 (Carboxilesteraza) para la construcción del árbol de distancias.

El análisis del árbol de distancias mostró que la proteína codificada por el ORF 1 se encuentra relacionada con la familia III. Esta familia incluye lipasas extracelulares de *Streptomyces* sp, y *Moraxella* sp (Joshi y Sharma 2007), presentan el plegamiento característico de las α/β hidrolasas y la típica triada catalítica (Arpigny y Jaeger 1999) (**Figura 14**). El análisis de los ORFs mediante el programa ProtParam mostró que la enzima codificada por el ORF 1 presenta una alta proporción de arginina y un punto isoelectrico de 12.48 (**Tabla 11**).

Tabla 11. Peso molecular (PM), punto isoelectrico (pI) y % de aminoácidos de los ORFs 1 (Carboxilesterasa), 4 (Cutinasa) y 5 (regulador transcripcional) establecidos mediante ProtParam. Fuente: Autor.

ORF	Carboxilesterasa	Cutinasa	Regulador transcripcional
Aminoácido	Composición		
Ala (A)	(34) 12,5%	(35) 2,2%	(15) 6,8%
Arg (R)	(81) 29,8%	(16) 4,7%	(28) 12,6
Asn (N)	(10) 3,7%	(9) 2,6%	(1) 0,5%
Asp (D)	(10) 3,7%	(19) 5,6%	(16) 7,2%
Cys (C)	(2) 0,7%	(8) 2,3%	(3) 1,4%
Gln (Q)	(5) 1,8%	(8) 2,3%	(7) 3,2%
Glu (E)	(6) 2,2%	(8) 2,3%	(16) 7,2%
Gly (G)	(20) 7,4%	(27) 7,9%	(19) 8,6%
His (H)	(11) 4%	(9) 2,6%	(4) 1,8%
Ile (I)	(5) 1,8%	(11) 3,2%	(4) 1,8%
Leu (L)	(19) 7%	(17) 5%	(29) 13,1%
Lys (K)	(1) 0,4%	(1) 0,3%	(2) 0,9%
Met (M)	(0) 0%	(5) 1,5%	(7) 3,2%
Phe (F)	(0) 0%	(12) 3,5%	(7) 3,2%
Pro (P)	(31) 11,4%	(40) 11,7%	(13) 5,9%
Ser (S)	(15) 5,5%	(28) 8,2%	(9) 4,1%
Thr (T)	(11) 4%	(45) 13,2%	(9) 4,1%
Trp (w)	(0) 0%	(6) 1,8%	(8) 3,6%
Tyr (Y)	(1) 0,4%	(3) 0,9%	(6) 2,7%
Val (V)	(10) 3,7%	(35) 10,2%	(19) 8,6%
Pyl (O)	(0) 0%	(0) 0%	(0) 0%
Sec (U)	(0) 0%	(0) 0%	(0) 0%
	pI Teórico 12,48	pI Teórico 5,23	pI Teórico 6,13
	PM 31 KDa	PM 35.5 KDa	PM 25.5 KDa

Finalmente cabe mencionar que la comparación entre los ORFs 1,4 y 5 y la esterasa del clon BAA 3G2 a partir del alineamiento de secuencias utilizando el programa CLUSTALW2 mostró que

no había una relación significativa entre las secuencias de los ORFs y la esterasa (**Tabla 12**), razón por la cual podría afirmarse que se trata de enzimas diferentes.

Tabla 12. Alineamiento entre los ORFs 1,4 y 5 y la esterasa del clon BAA 3G2 utilizando el programa CLUSTALW2. Fuente: Autor.

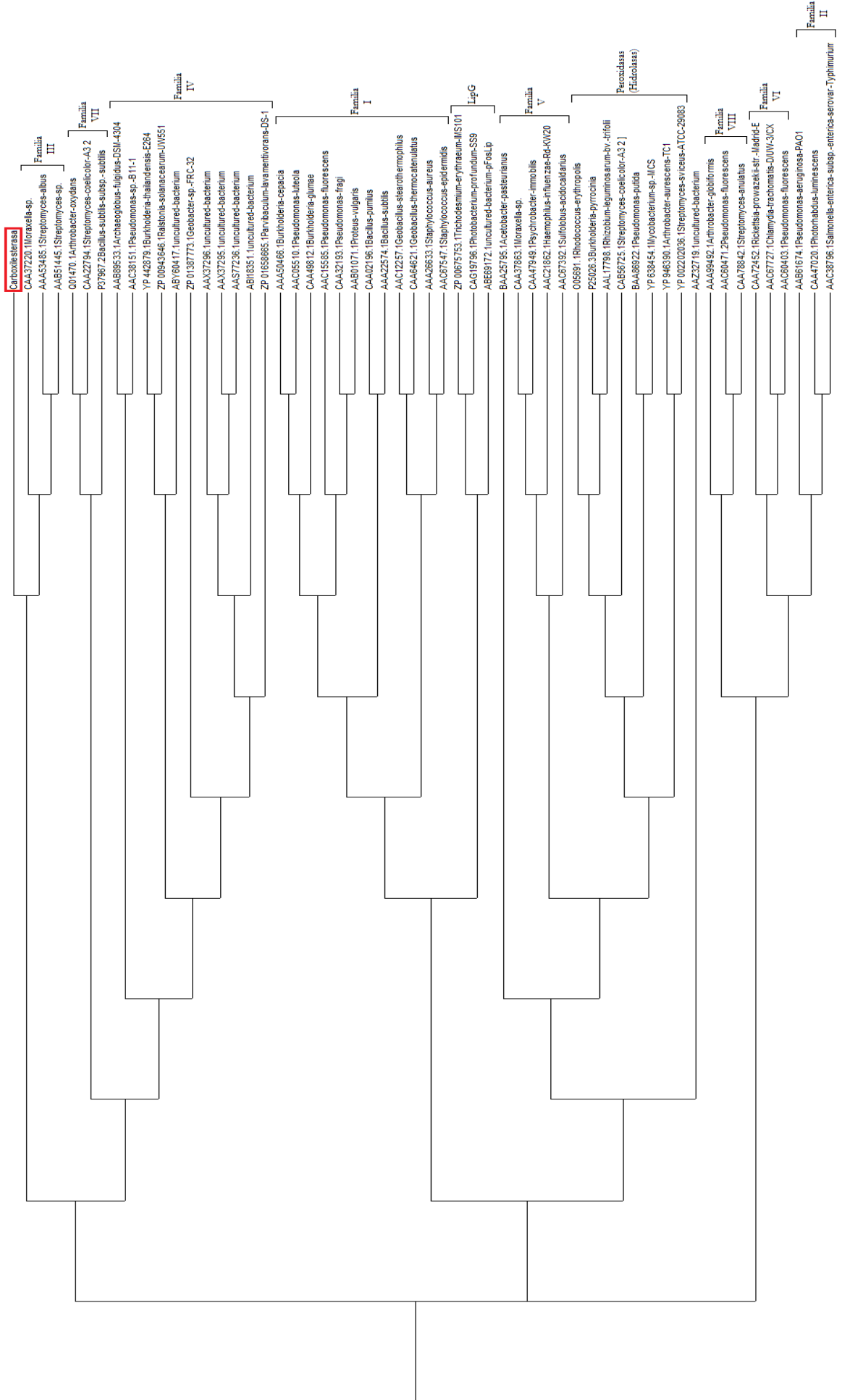
Alineamiento Esterasa clon BAA 3G2 (210 aa)

ORF	Score	Número de aminoácidos alineados
1 (272 aa)	10,48	40
4 (342 aa)	9,05	43
5 (222 aa)	9,52	28

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se puede sugerir que la enzima lipolítica presente en el clon BAA 3C3 está relacionada con la familia III, presenta aminoácidos que posiblemente forman parte de motivos conservados de las lipasas (SXG) donde S corresponde a la Serina catalítica. Se determinaron las posibles posiciones relativas de los aminoácidos que conforman la triada catalítica (**Tabla 10**), sin embargo, para confirmar esto se deben llevar a cabo estudios adicionales de mutagénesis dirigida. El análisis del contexto genómico del inserto metagenómico mostró que esta enzima está asociada a una metiltransferasa, una Acil-CoA deshidrogenasa, una cutinasa y un regulador transcripcional. La organización genómica de algunos de estos genes ya ha sido descrita en otros trabajos (**Tabla 9**).

De otra parte se determinó que el momento propicio para realizar la inducción adecuada del plásmido se encuentra entre la hora 5 y 9 y que el inserto metagenómico presente en dicho plásmido tenía un tamaño de 4899pb. Así mismo la presencia de halos alrededor de las colonias en agar LB suplementado con tributirina y la hidrólisis de pNP Acetato y pNP butirato, sugiere que la enzima lipolítica expresada por clon BAA 3C3 es una esterasa que posee preferencia por ácidos grasos de cadena corta y que además es termoestable y activa a valores de pH neutros y ligeramente alcalinos.

Figura 14. Árbol de distancias neighbor-joining de las familias de enzimas lipolíticas. El alineamiento y la construcción del árbol se realizaron utilizando los parámetros por defecto del programa CLUSTALW2 Fuente: Autor



6. CONCLUSIONES

Se verificó la capacidad lipolítica del clon BAA 3C3 en medio LB suplementado con tributirina como sustrato lipídico.

La enzima lipolítica del clon exhibió una actividad específica de 6,97 U/mg (+/- 0,141) en pNP-Acetato y 1,59 U/mg (+/-0,375) en pNP-Butirato, mostrando que posee preferencia por ácidos grasos de cadena corta por lo que se sugiere es una esterasa.

La enzima lipolítica del clon BAA 3C3 fue termoestable (60°) y activa a valores de pH neutros (7) y ligeramente alcalinos (8).

El análisis bioinformático mostró al ORF 1 asociado a una carboxilesterasa que podría estar relacionada con la actividad lipolítica del clon BAA 3C3 y se encuentra relacionada con la familia III de enzimas lipolíticas.

El análisis de contexto genómico mostró que la carboxilesterasa hipotética podría estar relacionada con una Acil-CoA deshidrogenasa, una metiltransferasa, una cutinasa y un regulador transcripcional.

7. RECOMENDACIONES

Realizar mutagénesis para la evaluación de los ORFs predichos con el fin de verificar su relación con la actividad lipolítica.

Sobre-expresar y purificar la enzima producida por el clon metagenómico BAA 3C3 con el fin de obtener una mejor aproximación de la actividad lipolítica de la enzima.

Evaluar la estabilidad de la enzima en diferentes solventes orgánicos, iones divalentes con el fin de determinar su potencial industrial.

Una vez confirmada la identidad de la enzima lipolítica, modelar la estructura 3D con base en la secuencia de aminoácidos predicha empleando herramientas bioinformáticas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbai N, Heerden E, Piater L, Litthauer D (2011) A deep gold mine metagenome as a source of novel esterases. *African Journal of Biotechnology* 10(32): 6090-6100
- Albino U, Saridakis D, Ferreira M, Hungria M, Vinuesa P, Andrade G (2006) High diversity of diazotrophic bacteria associated with the carnivorous plant *Drosera villosa* var. *villosa* growing in oligotrophic habitats in Brazil. *Plant Soil* 287: 199-207
- Altschul S, Madden T, Schaffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25(17): 3389-3402
- Aly M, Tork S, Al-Garni S, Nawar L (2012) Production of lipase from genetically improved *Streptomyces exfoliates* LP10 isolated from oilcontaminated soil. *African Journal of Microbiology Research* 6(6): 1125-1137
- Amann R, Ludwig, W, Schleifer K (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews* 59:143–169
- Antczak M, Kubiak A, Antczak T, Bielecki S (2009) Enzymatic biodiesel synthesis-key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy* 34:1185–1194
- Arpigny J, Jaeger K (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Society* 343: 177-183
- Arzeta L (2009) Purificación y Caracterización de la Estabilidad Térmica de la Enolasa de *Trypanosoma brucei*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, México
- Asoodeh A, Ghanbari T (2013) Characterization of an extracellular thermophilic alkaline esterase produced by *Bacillus subtilis* DR8806. *Journal of Molecular Catalysis* 85: 49-55
- Berlemont R, Pipers D, Delsaute M, Angiono F, Feller G, Galleni M, Power P (2011) Exploring the Antarctic soil metagenome as a source of novel cold-adapted enzymes and genetic mobile elements. *Revista Argentina de Microbiología* 43(2): 94-103
- Berlemont R, Spee O, Delsaute M, Lara Y, Schuldes J, Simon C, Power P, Daniel R, Galleni M (2013) Novel organic solvent-tolerant esterase isolated by metagenomics: insights into the lipase/esterase classification. *Revista Argentina de Microbiología* 45: 3-12
- Bielen A, Cetkovic H, Long P, Schwab H, Abramic M, Vujaklija D (2009) The SGNH-hydrolase of *Streptomyces coelicolor* has (aryl)esterase and a true lipase activity. *Biochimie* 91: 390-400

- Bloomer S, Adlercreutz P, Mattiasson B (1990) Triglyceride interesterification by lipases. Cocoa butter equivalents from a fraction of palm oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 67:519–524
- Bornscheuer U (2000) Strategies for improving the lipase catalysed preparation of chiral compounds. In: Gupta MN, (ed) *Methods in non-aqueous enzymology*. Basel: Birkhauser pp 90–109
- Bornscheuer U (2002) Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *Microbiology Reviews* 26: 73-81
- Bradford, M (1976) "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding". *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- Castro D, Peña C, Farrés A (2010) Producción y Características de cutinasas: Una alternativa interesante para biocatálisis a nivel industrial. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 13(1): 16-25
- Centro Colombiano de Genómica y Bioinformática de Ambientes Extremos GeBiX. Centro Colombiano de Genómica y Bioinformática de Ambientes Extremos GeBiX. [En línea] [Citado el: 10 de Enero de 2013.] <http://www.gebix.org.co>.
- Chandrasekaran G, Kim G, Shin H (2011) Purification and characterisation of an alkaliphilic esterase from a culinary medicinal mushroom, *Sparassis crispa*. *Food Chemistry* 124: 1376-1381
- Chen G, Kuan I, Hong J, Tsai B, Lee S, Yu C (2011) Activity enhancement and stabilization of lipase from *Pseudomonas cepacia* in polyallylamine-mediated biomimetic silica. *Biotechnology Letters* 33(3): 525-529
- Chopineau J, McCafferty F, Therisod M, Klibanov A (1988) Production of biosurfactants from sugar alcohols and vegetable oils catalyzed by lipases in a nonaqueous medium. *Biotechnology and Bioengineering* 31(3): 208–214
- Chu X, He H, Guo C, Sun B (2008) Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80: 615-625
- Contesinia F, Lopes D, Macedo G, Nascimento M, Carvalho P (2010) *Aspergillus* sp. lipase: potential biocatalyst for industrial use. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 7: 163–171

- Couto G, Glogauer A, Faoro H, Chubatsu L, Souza E, Pedrosa F (2010) Isolation of a novel lipase from a metagenomic library derived from mangrove sediment from the south Brazilian coast. *Genetics and Molecular Research* 9(1): 514- 523
- Curtis T, Sloan W (2004) Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Current Opinion in Microbiology* 7: 221-226
- DeAngelis K, Gladden J, Allgaier M, D'haeseleer P, Fortney J, Reddy A, Hugenholtz P, Singer S, Gheynst J, Silver W, Simmons B, Hazen T (2010) Strategies for Enhancing the Effectiveness of Metagenomic-based Enzyme Discovery in Lignocellulolytic Microbial Communities. *BioEnergy Research* 3: 146-158
- Derewenda Z, Derewenda U, Kobos P (1994) (His) C epsilon-H...O=C< hydrogen bond in the active sites of serine hydrolases. *Journal of Molecular Biology* 241 (1): 83-93
- Elend, C, Schmeisser C, Leggewie C, Babisk P, Carballeira D, Steele H, Reymond J, Jaeger K, Streitl W (2006) Isolation and Biochemical Characterization of Two Novel Metagenome-Derived Esterases. *Applied and Environmental Microbiology* 72(5): 3637-3645
- Fernandez-Lafuente R (2010) Thermomyces lanuginosus lipase: uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 62: 197–212
- Ferrer M, Golyshina O, Beloqui A, Golyshin P (2007) Mining enzymes from extreme environments. *Current Opinion in Microbiology* 10: 207-214
- Ferrer M, Golyshina O, Chernikova T, Khachane A, Martins Dos Santos V, Yakimov M, Timmis K, Golyshin P (2005) Microbial enzymes mined from the urania deep-sea hypersaline anoxic basin. *Chemical Biology* 12: 895-904
- Fersini F, Dall'Antonia Y, Chow J, Streit W, Mueller J (2012) Cloning, expression, purification and preliminary X-ray analysis of a putative metagenome-derived lipase. *Acta Crystallographica* 68: 923-926
- Fierer N, Lauber C, Ramirez K, Zaneveld J, Bradford M, Knight R (2012) Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *International Society for Microbial Ecology* 6: 1007-1017
- Fisher M, Pleiss J (2003) The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucleic Acids Research* 31(1): 319-321
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A., Duvaud S, Wilkins M, Appel R, Bairoch A (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press pp. 571-607

- Ghazanfar S, Azim A, Ghazanfar M, Anjum M, Begum I (2010) Metagenomics and its application in soil microbial community studies: biotechnological prospects. *Journal of Animal & Plant Sciences* 6(2): 611-622
- Glick B (1995) Metabolic Load and Heterologous Gene Expression. *Biotechnology Advances* 13(2): 247-261
- Godfrey T (1995) Lipases for industrial use. *Lipid Technology* 7: 58–61
- González J, Rodríguez J, Del Monte A (2010) Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Revista Colombiana de Biotecnología* 12(1): 124-140
- Gupta N, Rathi P, Gupta R (2002) Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Analytical Biochemistry* 311(1): 98–99
- Gupta R, Gupta N, Rathi P (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 763-781
- Gupta R, Rathi P, Gupta N, Bradoo S (2003) Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 33: 63-71
- Han Z, Han S, Zheng S, Lin Y (2009) Enhancing thermostability of a *Rhizomucor miehei* lipase by engineering a disulfide bond and displaying on the yeast cell surface. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(1): 117-126
- Handelsman J (2004) Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68(4): 669-685
- Hansen L, Knudsen S, Sorensen S (1998) The Effect of the lacY Gene on the Induction of IPTG Inducible Promoters, Studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Current Microbiology* 36(6): 341-347
- Hasan F, Shah A, Hameed A (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 235–251.
- Hawksworth D (2001) The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105: 1422-1432
- Heath C, Hu X, Cary C, Cowan D (2009) Isolation and characterization of a novel, low-temperature-active alkaliphilic esterase from an Antarctic desert soil metagenome. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 4657-4659
- Hernández R, Velázquez I, Orozco M, Santoyo G (2010) Soil Metagenomics: new challenges and biotechnological opportunities. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 79: 133-139

- Hills M, Kiewitt I, Mukherjee K (1990) Lipase from *Brassica napus* L. discriminates against cis-4 and cis-6 unsaturated fatty acids and secondary and tertiary alcohols. *Biochimica et Biophysica Acta* 1042: 237–240
- Hong K, Koh C, Sam C, Yin W, Chan K (2012b) NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/13511316>. Consultado Junio 10 2013
- Hong K, Koh C, Sam C, Yin W, Chan K (2012a) NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/13508068>. Consultado Junio 10 2013
- Hong S, Lee C, Jang S (2012) Purification and properties of an extracellular esterase from a cold-adapted *Pseudomonas mandelii*. *Biotechnology Letters* 34: 1051-1055
- Hotelier T, Renault L, Cousin X, Negre V, Marchot P, Chatonnet A (2004) ESTHER, the database of the a/b-hydrolase fold superfamily of proteins. *Nucleic Acids Research* 32: 145-147
- Huson D, Richter D, Mitra S, Auch A, Schuster S (2009) Methods for comparative metagenomics. *Bioinformatics* 10(1): 1-10
- Jaeger K, Eggert T (2002) Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 390-397
- Jeon J, Kim J, Kang S, Lee J, Kim S (2009) Characterization and its Potential Application of Two Esterases Derived from the Arctic Sediment Metagenome. *Marine Biotechnology* 11(3): 307-316
- Jiang X, Xu X, Huo Y, Wu Y, Zhu X, Zhang X, Wu M (2012) Identification and characterization of novel esterases from a deep-sea sediment metagenome. *Archives of Microbiology* 194: 207-214
- Jiménez D, Montaña J, Álvarez D, Baena S (2012) A novel cold active esterase derived from Colombian high Andean forest soil metagenome. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 361-370
- Joshi G, Sharma V (2007) Bacterial Lipases: Classification, Properties and Applications in Biotechnology. *Research Journal Of BioTechnology* 2(2): 50-56
- Kajanavas P, Khuchareontaworn S, Khawsak P, Pakpitcharoen A, Pothivejkul K, Santiwatanakul S, Matsui K, Kajiwara T, Chansiri K (2010) Purification and Characterization of Organic Solvent and Detergent Tolerant Lipase from Thermotolerant *Bacillus* sp. RN2. *International Journal of Molecular Sciences* 11(10): 3783-3792
- Kapoor M, Gupta M (2012) Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry* 47: 555–569

- Kempler G (1983) Production of flavor compounds by microorganisms. *Advances in Applied Microbiology* 29: 29–51
- Kim J, Choi G, Kim S, Kim W, Lee J, Ryu Y, Kim G (2004) Enhanced thermostability and tolerance of high substrate concentration of an esterase by directed evolution. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 27(4): 169-175
- Krishna S, Karanth N (2002) Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. *Catalysis Reviews* 44: 499–591
- Krishna S, Manohar B, Divakar S, Prapulla S, Karanth N (2000) Optimization of isoamyl acetate production by using immobilized lipase from *Mucor miebei* by response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 131–136
- Kumar R, Sharma M, Singh R, Kaur J (2013) Characterization and evolution of a metagenome-derived lipase towards enhanced enzyme activity and thermostability. *Molecular and Cellular Biochemistry* 373: 149-159
- Lee S, Won K, Lim H, Kim J, Choi G, Cho K (2004) Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65(6): 720-726
- Lew J, Kapopoulou A, Jones L, Cole S (2013) NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/887857> Consultado Junio 10 2013
- Liu K, Wang J, Bu D, Zhao S, McSweeney C, Yu P, Li D (2009) Isolation and biochemical characterization of two lipases from a metagenomic library of China Holstein cow rumen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 385: 605–611
- Lu J, Bringham C, Rha C, Sinskey A (2013) Characterization of an extracellular lipase and its chaperone from *Ralstonia eutropha* H16. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(6): 2443-2454
- Lucas S, Copeland A, Lapidus A, Cheng J, Goodwin L, Pitluck S, Davenport K, Detter J, Han C, Tapia R, Land M, Hauser L, Kyrpides N, Ivanova N, Ovchinnikova G, Pagani I, Brumm P, Mead D, Woyke T (2012a) NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11371526>. Consultado Junio 10 2013
- Lucas S, Copeland A, Lapidus A, Glavina del Rio T, Dalin E, Tice H, Bruce D, Goodwin L, Pitluck S, Sims D, Meineke L, Brettin T, Detter J, Han C, Larimer F, Land M, Hauser L, Kyrpides N, Ovchinnikova G, Liberton M, Stoeckel J, Banerjee A, Singh A, Page L, Sato H, Zhao L, Sherman L, Pakrasi H, Richardson P (2013) NCBI.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=220907980\[PUID\]%20OR%20219864591\[PUID\]&RID=V449NT4E01R&log\\$=genealign&blast_rank=4](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=220907980[PUID]%20OR%20219864591[PUID]&RID=V449NT4E01R&log$=genealign&blast_rank=4). Consultado Junio 10 2013

- Lucas S, Han J, Lapidus A, Cheng J, Goodwin L, Pitluck S, Peters L, Ivanova N, Daligault H, Detter J, Han C, Tapia R, Land M, Hauser L, Kyrpides N, Ivanova N, Pagani I, Hagen A, Katz L, Fiedler H, Keasling J, Fortman J, Woyke T (2012c) NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11091987>. Consultado Junio 10 2013
- Lucas S, Han J, Lapidus A, Cheng J, Goodwin L, Pitluck S, Peters L, Ivanova N, Daligault H, Detter J, Han C, Tapia R, Land M, Hauser L, Kyrpides N, Ivanova N, Pagani I, Hagen A, Katz L, Fiedler H, Keasling J, Fortman J, Woyke T (2012b) NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11092105>. Consultado Junio 10 2013
- Luo Z, Wu Y, Chow R, Luo J, Gu J, Vrijmoed L (2012) Purification and characterization of an intracellular esterase from a *Fusarium* species capable of degrading dimethyl terephthalate. *Process Biochemistry* 47: 687-693
- Margesin R, Feller G, Hammerle M, Stegner U, Schinner F (2002) A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil. *Biotechnology Letters* 24: 27-33
- Margolin A (1993) Enzymes in the synthesis of chiral drugs. *Enzyme and Microbial Technology* 15: 266–280
- McMullen P, Gillaspay A, Gipson J, Bobo L, Skiest D, Freitag N (2013) NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12795691>. Consultado Junio 10 2013
- Meilleur C, Hupe JF, Juteau P, Shareck F (2009) Isolation and characterization of a new alkali-thermostable lipase cloned from a metagenomic library. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36(6): 853–861
- Messaoudi A, Belguith H, Gram I, Ben Hamida J (2010) Classification of EC 3.1.1.3 bacterial true lipases using phylogenetic analysis. *African Journal of Biotechnology* 9(48): 8243-8247
- Montaña J, Jiménez D, Hernández M, Ángel T, Baena S (2011) Taxonomic and functional assignment of cloned sequences from high Andean forest soil metagenome. *Antonie van Leeuwenhoek* 101(2): 205-215
- Montaña J, Jiménez D, Hernández M, Ángel T, Baena S (2012) Taxonomic and functional assignment of cloned sequences from high Andean forest soil metagenome. *Antonie van Leeuwenhoek* 101: 205-215
- Nacke H, Will C, Herzog S, Nowka B, Engelhaupt M, Daniel R (2011) Identification of novel lipolytic genes and gene families by screening of metagenomic libraries derived

from soil samples of the German Biodiversity Exploratories. *Microbiology Ecology* 78(1): 188-201

- Nagarajan S (2012) New Tools for Exploring “Old Friends—Microbial Lipases”. *Microbiology and Biotechnology* 168: 1163-1196
- Navarro I (2012) Clonación, expresión, caracterización y modelado de esterasas putativas de *Corynebacterium glutamicum* ATTC 13032. *Anales de Biología* 34: 75-87
- Nierman W, Pain A, Anderson M, Wortman J, Kim H, Arroyo J, Berriman M, Abe K, Archer D, Bermejo C, Bennett J, Bowyer P, Chen D, Collins M, Coulsen R, Davies R, Dyer P, Farman M, Fedorova N, Feldblyum T, Fischer R, Fosker N, Fraser A, Garcia J, Garcia M, Goble A, Goldman G, Gomi K, Griffith-Jones S, Gwilliam R, Haas B, Haas H, Harris D, Horiuchi H, Huang J, Humphray S, Jimenez J, Keller N, Khouri H, Kitamoto K, Kobayashi T, Konzack S, Kulkarni R, Kumagai T, Lafon A, Latge J, Li W, Lord A, Lu C, Majoros W, May G, Miller B, Mohamoud Y, Molina M, Monod M, Mouyna I, Mulligan S, Murphy L, O'Neil S, Paulsen I, Penalva M, Perteza M, Price C, Pritchard B, Quail M, Rabbinowitsch E, Rawlins N, Rajandream M, Reichard U, Renauld H, Robson G, Rodriguez de Cordoba S, Rodriguez-Pena J, Ronning C, Rutter S, Salzberg S, Sanchez M, Sanchez-Ferrero J, Saunders D, Seeger K, Squares R, Squares S, Takeuchi M, Tekaia F, Turner G, Vazquez de Aldana C, Weidman J, White O, Woodward J, Yu J, Fraser C, Galagan J, Asai K, Machida M, Hall N, Barrell B, Denning D (2005) NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3513265>. Consultado Junio 10 2013
- Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, Yamashita A, Hattori M, Horinouchi S (2012) NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6215796>. Consultado Junio 10 2013
- Ollis D, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken S, Harel M, Remington S, Silman I, Schrag J, Sussman J, Verschueren K, Goldman A (1992) The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Engineering* 5: 197-211
- ORF Finder (2013) http://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html. Consultado Junio 11 2013
- Pardo E, Cárcamo C, Massardo L, Mezzano V, Jacobelli S, Gonzáles A, Soza A (2006) Autoanticuerpos anti-galectina-8 en pacientes con lupus eritematoso sistémico. *Revista Médica de Chile* 134: 159-166
- Parques Nacionales Naturales de Colombia. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Parques Nacionales Naturales de Colombia. [En línea] [Citado el: 27 de Noviembre de 2012.]

<http://www.parquesnacionales.gov.co/PNN/portel/libreria/php/decide.php?patron=01.201203>

http://www.parquesnacionales.gov.co/PNN/portel/libreria/php/decide.php?h_id=256&patron=01.02290802.

- Peng Q, Zhang X, Shang M, Wang X, Wang G, Li B, Guan G, Li Y, Wang Y (2011) A novel esterase gene cloned from a metagenomic library from neritic sediments of the South China Sea. *Microbial Cell Factories* 10: 95-105
- Peng R, Lin J, Wei D (2010) Purification and Characterization of an Organic Solvent-Tolerant Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* CS-2. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162(3): 733-743
- Petersen E, Valinger G, Solkner B, Stubenrauch G, Schwab H (2001) A novel esterase from *Burkholderia gladioli* shows deacetylation activity on cephalosporins is related to L-lactamases and DD-peptidases. *Journal of Biotechnology* 89: 11-25
- Ping X, Heath C, Taylor M, Tuffin M, Cowan D (2012) A novel, extremely alkaliphilic and cold-active esterase from Antarctic desert soil. *Extremophiles* 16: 79-86
- Pribnow D (1975) Nucleotide sequence of an RNA Polymerase Binding Site at an Early T7 Promoter. *Panas* 72: 784-788
- Ramani K, Chockalingam E, Sekaran G (2010) Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 37(5): 531-535
- Ribeiro B, De Castro A, Coelho M, Freire D (2011) Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Research* 1: 615-803
- Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Dallas, USA
- Schmid R, Verger R (1998) Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International* 37: 1608–33
- Shibata N, Okanuma N, Hirai K, Arikawa K, Kimura M, Okawa Y (2006) Isolation, characterization and molecular cloning of a lipolytic enzyme secreted from *Malassezia pachydermatis*. *Microbiology Letters* 256(1): 137-144
- Shine J, Dalgarno L (1975). «Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes». *Nature* 254 (5495): pp. 34-38.

- Sifour M, Saeed HM, Zaghloul TI, Berekaa MM, Abdel-Fattah YR (2010) Purification and Properties of a Lipase from Thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* Strain-5. *International Journal of Biological Chemistry* 4(4): 203-212
- Singh J, Behal A, Singla N, Joshi A, Birbian N, Singh S, Bali V, Batra N (2009) Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances. *Biotechnology Journal* 4: 480-494
- Sipkema D, Schippers K, Maalcke W, Yang Y, Salim S, Blanch H (2011) Multiple Approaches To Enhance the Cultivability of Bacteria Associated with the Marine Sponge *Haliclona (gellius)* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 77(6): 2130-2140
- Staley J, Konopka A (1985) Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology* 39: 321–346
- StarOrf (2013) <http://star.mit.edu/orf/index.html?gclid=CNmbluWz37cCFYVZ7AodR1QAmg>. Consultado Junio 11 2013
- Stothard P (2000) The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28:1102-1104.
- Streit W, Daniel R, Jaeger K (2004) Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology* 15(4): 285-90
- Sumbly K, Matthews A, Garbin P, Jiranek V (2009) Cloning and Characterization of an Intracellular Esterase from the Wine-Associated Lactic Acid Bacterium *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology* 75(21): 6729-6735
- Takaç S, Marul B (2008) Effects of lipidic carbon sources on the extracellular lipolytic activity of a newly isolated strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35(9): 1019-1025
- Tatusov T, Tatusov R (2013) NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>. Consultado Junio 11 2013
- Tirawongsaroj P, Sriprang R, Harnpicharnchai P, Thongaram T, Champreda V, Tanapongpipat S, Pootanakit K, Eurwilaichitr L (2008) Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. *Journal of Biotechnology* 133(1): 42-49

- Torres M, Valencia S, Bernal J, Martinez P (2000) Isolation of *Enterobacteria*, *Azotobacter* sp. And *Pseudomonas* sp., producers of indole-3-acetic acid and siderophores, from Colombian rice rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42: 171-176
- Tringe S, Mering C, Kobayashi A, Salamov A, Chen K, Chang W, Podar M, Short J, Mathur E, Detter J, Bork P, Hugenholtz P, Rubin E (2005) Comparative Metagenomics of Microbial Communities. *Science* 308(5721): 554-557
- Ulrich A, klimke G, Wirth S (2008) Diversity and activity of cellulose-descomposing bacteria, isolated from a sandy and a loamy soil after long-term manure application. *Microbial Ecology* 55(3): 512-522
- Uppenberg J, Trier Hansen M, Patkar S, Jones T (1994) The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida Antarctica*. *Structure* 2(4): 293-308
- Useche Y, Valencia H, Perez H (2004) Caracterización de bacterias y hongos solubilizadores de fosfato bajo tres suelos en el sur del trapecio amazónico. *Acta Biológica Colombiana* 9(2): 129-132
- Van Elsas J, Torsvik V, Hartman A, Ovreas L, Jansson J (2007) The *Bacteria* and *Archea* in soil. In: *Modern Soil Microbiology*. Second edition. CRC press, Taylor and Francis Group, New York 83:105
- Van Wyngaarden W, Fandiño M (2002) Parque Nacional “Los Nevados”. Un caso de selección y zonificación de áreas de conservación biológica. En serie: Investigación 4. Javegraf (eds.) Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia
- Vishnupriya B, Sundaramoorthi C, Kalaivani M, Selvam K (2010) Production of lipase from *Streptomyces griseus* and evaluation of Bioparameters. *International Journal of ChemTech Research* 2(3): 1380-1383
- Vulfson E (1994) Industrial applications of lipases. In: Woolley P, Peterson SB, (ed) Lipases their structure, biochemistry and applications. Cambridge University Press, pp 271–88
- Yamaguchi S, Takeuchi K, Mase T, Oikawa K, McMullen T, Derewenda U, McElhaney R, Kay C, Derewenda Z (1996) The consequences of engineering an extra disulfide bond in the *Penicillium camembertii* mono- and diglyceride specific lipase. *Protein Engineering* 9(9): 789-795

- Yoo H, Simkhada J, Cho S, Park D, Kim S, Seong C, Yoo J (2011) A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. *Bioresource Technology* 102(10): 6104-6111

9. ANEXOS

ANEXO 1. Protocolo extracción y purificación de ADN plasmídico

Miniprep (Lisis alcalina)

Sambrook 2001

1. Tomar una colonia aislada de *E.coli* (transformada o sin transformar) y adicionarla a 5 ml de caldo LB + antibiótico. Incubar en agitación toda la noche a 37°C.
2. Tomar 1.5 ml de cultivo, adicionarlo en un tubo eppendorf y centrifugar a 10.000 rpm durante 2 minutos a 4°C. Descartar el sobrenadante. (Si no se obtiene suficiente pellet, repetir.)
3. Resuspender en 100 µl de solución I fría (50 mM glucosa; 25 mM Tris HCl pH 8.0; 10 mM EDTA pH 8.0).
4. Adicionar 200 µl de solución II recién preparada (0.2 N NaOH; 1% SDS), mezclar por inversión. Incubar en hielo por 5 minutos.
5. Adicionar 150 µl de solución III fría (5 M acetato de potasio; ácido acético glacial; agua), mezclar suavemente por inversión e incubar en hielo entre 3 y 5 minutos.
6. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
7. Adicionar en igual volumen fenol: cloroformo, mezclar.
8. Centrifugar a 12.000 rpm por 2 minutos a 4°C. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
9. Precipitar el ADN con 2 volúmenes de etanol 100%. Centrifugar a 10.000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
10. Descartar el sobrenadante, dejar secar el pellet.
11. Lavar el pellet con 500 µl de etanol 70%. Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
12. Descartar el sobrenadante y dejar secar por 10 minutos.
13. Adicionar 50 µl de TE + RNAsa A (20 µg/ml).
14. Almacenar a -20 °C.

ANEXO 2. Protocolo de preparación de células electrocompetentes

Medio SOB (1 l): 20 gr bacto triptona; 5 gr bacto extracto de levadura; 2 ml NaCl 5M; 25 ml KCl 100 mM. Autoclavar y agregar 10 ml MgCl₂ 1M y 10 ml MgSO₄ 1M estériles.

Medio SOC (1 l): misma composición que SOB más 20 ml de glucosa 1M.

ELECTROCOMPETENTES

- Agregar 10ml de *E.coli* XL1-Blue (crecidas a 37° C toda la noche a partir de una colonia aislada de una placa LB-tet estriada fresca del día anterior) a un Erlenmeyer con 500 ml de medio SOB suplementado con 5 ml de glucosa 10%.
- Crecer en agitación a 37°C por aproximadamente 3-4 horas hasta llegar a una DO₆₆₀ M = 0,6 – 0,7.
- Enfriar el cultivo inmediatamente durante 15 min. A partir de este punto realizar todos los pasos del procedimiento en frío.
- Pasar el cultivo crecido a dos botellas esterilizadas de 500 ml y centrifugar las bacterias a 3000 xg a 4°C por 10'. Resuspender cada pellet en 12,5 ml de glicerol al 10 % frío; juntar ambos pellets en una botella y llevar a un volumen de 250ml con glicerol al 10 %.
- Centrifugar a 3000xg a 4°C por 10', y repetir el procedimiento 2 veces.
- Resuspender el último pellet resuspenderlo en 25 ml de glicerol al 10% y pasar a una botella estéril más pequeña.
- Centrifugar a 2500xg durante 15' y descartar con cuidado el sobrenadante de forma tal que quede un resto de aproximadamente 5ml de bacterias en suspensión.
- Homogeneizar y hacer alícuotas de 45 μ l en tubos Eppendorf enfriados y estériles.
- Congelar inmediatamente en nitrógeno líquido y guardar a -70°C.

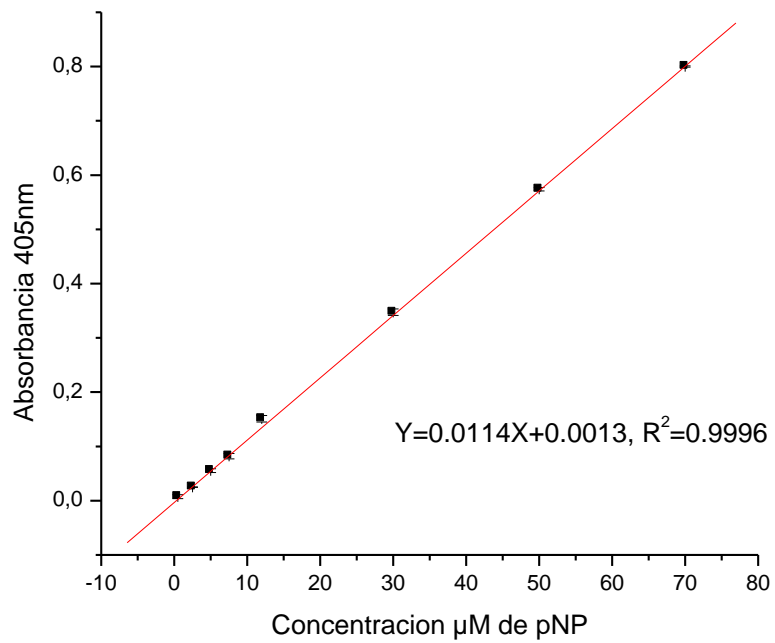
ELECTROPORACIÓN

- Poner las celdas de electroporación (0,2 cm) en hielo.
- En un Eppendorf® mezclar 40 μ l de bacterias electrocompetentes con 1-2 μ l de ligación o plásmido. Dejar en hielo 30"-1'.

- Pasar a la celda de electroporación.
- Condiciones del electroporador (Bio-Rad): 200 Ω , 2,5 μ F, 2,5 KV.
- Dar un pulso.
- Agregar 1ml de SOC y lavar la celda.
- Transferir a un Eppendorf.
- Incubar a 37°C 1 hora.
- Plaquear.

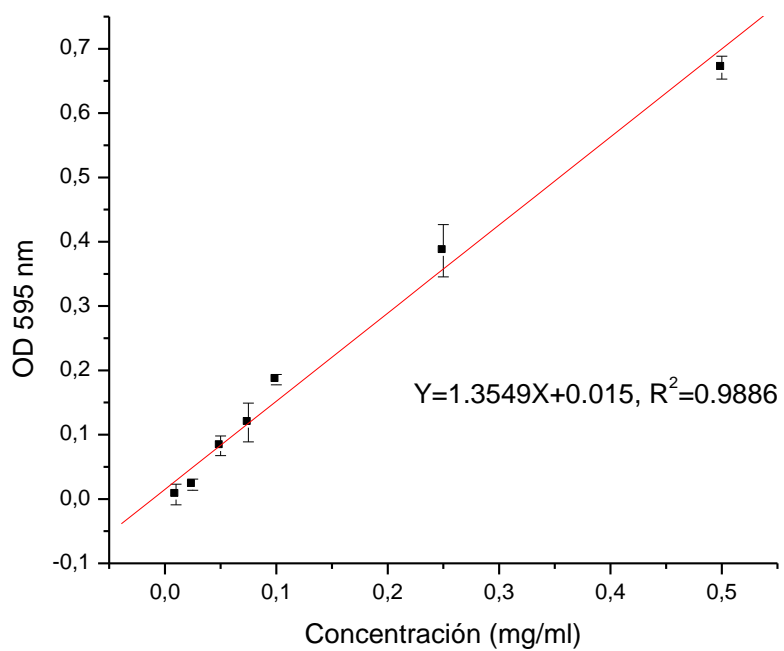
ANEXO 3. Curva patrón pNPesteres

Concentración (mM)	Abs (405nm)
70	0,800
50	0,574
30	0,347
12	0,151
7,5	0,082
5	0,055
2,5	0,025
0,5	0,007



ANEXO 4. Curva patrón Bradford

Concentración (mg/ml)	Abs (595nm)
0,01	0,007
0,025	0,022
0,05	0,083
0,075	0,119
0,1	0,186
0,25	0,386
0,5	0,671



ANEXO 5. Análisis estadístico temperatura

Tests of Normality(b)

Temperatur a	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Umg 10°C	,498	12	,000	,481	12	,000
30°C	,455	12	,000	,580	12	,000
37°C	,301	12	,004	,813	12	,013
60°C	,313	12	,002	,810	12	,012

a Lilliefors Significance Correction

b Umg is constant when Temperatura = 4°C. It has been omitted.

Test of Homogeneity of Variances

Umg

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
29,000	4	55	,000

Kruskal wallis

Statistix 9.0

03/05/2013, 02:09:05 p.m.

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for V004 by V001

V001	Mean Rank	Sample Size
4°C	22,0	12
10°C	25,8	12
30°C	28,3	12
37°C	37,1	12
60°C	39,3	12
Total	30,5	60

Kruskal-Wallis Statistic 13.6112
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0086

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	4	2623.5	655.875	4.12	0.0054
Within	55	8748.5	159.064		
Total	59	11372.0			

Total number of values that were tied 47
Max. diff. allowed between ties 0,00001

Cases Included 60 Missing Cases 0

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Umg

		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval			
(I) Temperatura	(J) Temperatura	Lower Bound	Upper Bound		Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	
Tukey HSD	4°C	10°C	-,085630	,263206	,998	-,82796	,65670	
		30°C	-,171003	,263206	,966	-,91333	,57132	
		37°C	-,636038	,263206	,126	-1,37836	,10629	
		60°C	-					
			1,038398(*)	,263206	,002	-1,78072	-,29607	
)					
	10°C	4°C	,085630	,263206	,998	-,65670	,82796	
		30°C	-,085372	,263206	,998	-,82770	,65695	
		37°C	-,550407	,263206	,239	-1,29273	,19192	
		60°C	-					
			,952767(*)	,263206	,006	-1,69509	-,21044	
	30°C	4°C	,171003	,263206	,966	-,57132	,91333	
	10°C	,085372	,263206	,998	-,65695	,82770		
	37°C	-,465035	,263206	,403	-1,20736	,27729		
	60°C	-						
		,867395(*)	,263206	,014	-1,60972	-,12507		
37°C	4°C	,636038	,263206	,126	-,10629	1,37836		
	10°C	,550407	,263206	,239	-,19192	1,29273		
	30°C	,465035	,263206	,403	-,27729	1,20736		
	60°C	-,402360	,263206	,549	-1,14469	,33997		
60°C	4°C	1,038398(*)	,263206	,002	,29607	1,78072		
)						
	10°C	,952767(*)	,263206	,006	,21044	1,69509		
	30°C	,867395(*)	,263206	,014	,12507	1,60972		
	37°C	,402360	,263206	,549	-,33997	1,14469		

ANEXO 6. Análisis estadístico pH

Tests of Normality (b,c,d,e)

pH	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Umg pH 6	,499	12	,000	,465	12	,000
pH 7	,327	12	,001	,737	12	,002
pH 8	,313	12	,002	,810	12	,012

a Lilliefors Significance Correction

b Umg is constant when pH = pH 3. It has been omitted.

c Umg is constant when pH = pH 4. It has been omitted.

d Umg is constant when pH = pH 5. It has been omitted.

e Umg is constant when pH = pH 10. It has been omitted.

Descriptives(a,b,c,d)

pH	Statistic	Std. Error	
Umg pH 6	Mean	,01599	
	95% Confidence Lower Bound	-,00774	
	Interval for Mean Upper Bound	,03972	
	5% Trimmed Mean	,01244	
	Median	,00000	
	Variance	,001	
	Std. Deviation	,037347	
	Minimum	,000	
	Maximum	,096	
	Range	,096	
	Interquartile Range	,000	
	Skewness	2,055	,637
	Kurtosis	2,640	1,232
	pH 7	Mean	3,11210
		95% Confidence Lower Bound	1,01512
Interval for Mean Upper Bound		5,20908	
5% Trimmed Mean		3,06223	
Median		2,53951	
Variance		10,893	
Std. Deviation		3,300412	
Minimum		,000	
Maximum		7,122	
Range		7,122	
Interquartile Range		6,565	
Skewness		,100	,637
Kurtosis		-2,265	1,232
pH 8		Mean	1,03840
		95% Confidence Lower Bound	,29478
	Interval for Mean Upper Bound	1,78201	
	5% Trimmed Mean	,98079	
	Median	,62830	
	Variance	1,370	

Std. Deviation	1,170366	
Minimum	,000	
Maximum	3,114	
Range	3,114	
Interquartile Range	2,208	
Skewness	,480	,637
Kurtosis	-1,416	1,232

- a U_{mg} is constant when pH = pH 3. It has been omitted.
- b U_{mg} is constant when pH = pH 4. It has been omitted.
- c U_{mg} is constant when pH = pH 5. It has been omitted.
- d U_{mg} is constant when pH = pH 10. It has been omitted.

Test of Homogeneity of Variances

U_{mg}

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
222,190	6	77	,000

Kruskal Wallis

Statistix 9.0

03/05/2013, 12:52:37 p.m.

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for V004 by V001

V001	Mean Rank	Sample Size
pH 3	35,5	12
pH 4	35,5	12
pH 5	35,5	12
pH 6	41,5	12
pH 7	58,5	12
pH 8	55,5	12
pH 10	35,5	12
Total	42,5	84

Kruskal-Wallis Statistic 29.7749
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0000

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	6	7464.0	1244.00	7.18	0.0000
Within	77	13342.5	173.28		
Total	83	20806.5			

Total number of values that were tied 74
Max. diff. allowed between ties 0,00001

Cases Included 84 Missing Cases 0

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Umg

	(I) pH	(J) pH	Mean	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval			
			Difference (I-J)			Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	pH 3	pH 4	,000000	,540367	1,000	-1,63605	1,63605		
		pH 5	,000000	,540367	1,000	-1,63605	1,63605		
		pH 6	-,015991	,540367	1,000	-1,65204	1,62006		
	pH 4	pH 7	-	3,112098(*)	,540367	,000	-4,74815	-1,47605	
		pH 8	-1,038398	,540367	,473	-2,67445	,59765		
		pH 10	,000000	,540367	1,000	-1,63605	1,63605		
		pH 3	,000000	,540367	1,000	-1,63605	1,63605		
		pH 5	,000000	,540367	1,000	-1,63605	1,63605		
		pH 6	-,015991	,540367	1,000	-1,65204	1,62006		
	pH 5	pH 7	-	3,112098(*)	,540367	,000	-4,74815	-1,47605	
		pH 8	-1,038398	,540367	,473	-2,67445	,59765		
		pH 10	,000000	,540367	1,000	-1,63605	1,63605		
		pH 3	,000000	,540367	1,000	-1,63605	1,63605		
		pH 4	,000000	,540367	1,000	-1,63605	1,63605		
		pH 6	-,015991	,540367	1,000	-1,65204	1,62006		
	pH 6	pH 7	-	3,112098(*)	,540367	,000	-4,74815	-1,47605	
		pH 8	-1,038398	,540367	,473	-2,67445	,59765		
		pH 10	,000000	,540367	1,000	-1,63605	1,63605		
		pH 3	,015991	,540367	1,000	-1,62006	1,65204		
		pH 4	,015991	,540367	1,000	-1,62006	1,65204		
		pH 5	,015991	,540367	1,000	-1,62006	1,65204		
	pH 7	pH 7	-	3,096107(*)	,540367	,000	-4,73216	-1,46006	
		pH 8	-1,022406	,540367	,492	-2,65846	,61364		
		pH 10	,015991	,540367	1,000	-1,62006	1,65204		
		pH 3	3,112098(*)	,540367	,000	1,47605	4,74815		
		pH 4	3,112098(*)	,540367	,000	1,47605	4,74815		
		pH 5	3,112098(*)	,540367	,000	1,47605	4,74815		

	pH 6	3,096107(*)	,540367	,000	1,46006	4,73216
	pH 8	2,073700(*)	,540367	,005	,43765	3,70975
	pH 10	3,112098(*)	,540367	,000	1,47605	4,74815
pH 8	pH 3	1,038398	,540367	,473	-,59765	2,67445
	pH 4	1,038398	,540367	,473	-,59765	2,67445
	pH 5	1,038398	,540367	,473	-,59765	2,67445
	pH 6	1,022406	,540367	,492	-,61364	2,65846
	pH 7	-				
		2,073700(*)	,540367	,005	-3,70975	-,43765
	pH 10	1,038398	,540367	,473	-,59765	2,67445
pH 10	pH 3	,000000	,540367	1,000	-1,63605	1,63605
	pH 4	,000000	,540367	1,000	-1,63605	1,63605
	pH 5	,000000	,540367	1,000	-1,63605	1,63605
	pH 6	-,015991	,540367	1,000	-1,65204	1,62006
	pH 7	-				
		3,112098(*)	,540367	,000	-4,74815	-1,47605
	pH 8	-1,038398	,540367	,473	-2,67445	,59765

* The mean difference is significant at the .05 level.

