

Expresión heteróloga de la lipasa LipA de *Serratia marcescens* en *Escherichia coli* BL21

(DE3): Uso de una variante soluble para la transesterificación enzimática del aceite de palma africana con etanol (biodiésel)

Jenny Paola Díaz Landínez

Trabajo de Grado para optar el título de bióloga

Director:

Jorge Hernández Torres

Ph.D. Doctorât és Sciences

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2019

Agradecimientos

A mi querida familia, por su esfuerzo, cariño desmedido y por ser la motivación que me impulsó a perseverar en mis propósitos.

Al Centro Industrial y Biología Molecular (CINBIN) por abrirme las puertas y formarme como investigadora.

A mi director, Dr. Jorge Hernández Torres, por la cultura e instrucción profesional. Por promover en mí la afinidad hacia la Biología Molecular.

A Oriana Serna, por ser mi amiga y tutora de constantes recomendaciones y disposición desenfadada para compartir experiencias.

A Jefferson Barraza, por sus consejos y experiencia en el área química.

Al Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA) y al Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP) y por el apoyo solidario en el préstamo de la centrífuga.

A mis maestros de carrera, por elegir educar, compartir sus conocimientos y experiencias.

A mis amigos de carrera, los del laboratorio, los de Lebrija y Bucaramanga por ser ejemplo de personas graciosas y talentosas.

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander, por el financiamiento de este proyecto en el marco de macroproyecto 'evaluación de la transesterificación enzimática del aceite de palma africana con etanol (biodiesel), usando extractos crudos de *Escherichia coli* BL21 (DE3), transformada con genes mutantes derivados del diseño racional de formas solubles de dos lipasas bacterianas'.

Contenido

Introducción..	13
1. Objetivos	16
1.1 Objetivo General	16
1.2 Objetivos Específicos.....	16
2. Marco teórico	17
2.1 Biodiésel	17
2.1.1 Pirólisis.....	17
2.1.2 Microemulsificación.....	17
2.1.3 Transesterificación	18
2.2 Lipasas y su relación con el biodiésel	19
2.3 La lipasa LipA de <i>Serratia marcescens</i>	20
2.4 Ingeniería genética para la biocatálisis mejorada.....	21
2.5 Diseño de la proteína Sm_LipA_M1.....	22
3 Metodología.....	24
3.1 Construcción del vector de expresión recombinante.....	24
3.2 Transformación de la cepa hospedera <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	25
3.3 Inducción de la expresión de Sm_LipA_M1 con IPTG a	25
3.3.1 Visualización mediante electroforesis SDS-PAGE.....	26
3.3.2 Determinación de la concentración de proteínas por ensayo de Bradford.....	26
3.3.3 Determinación de la actividad hidrolítica del mutante Sm_LipA_M1 frente a p-nitrofe	

nil butirato (pNPB).....	26
3.4 Actividad catalítica de la variable soluble de LipA frente a cambios de pH y temperatura.....	27
3.4.1 pH.....	27
3.4.2 Temperatura.....	27
4. Resultados.....	28
4.1 Construcción del vector de expresión recombinante.....	28
4.2 Transformación de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	30
4.3 Sobreexpresión de la proteína Sm_LipA_M1.....	33
4.4 Actividad hidrolasa Sm_LipA_M1.....	36
4.5. Alteración de la actividad catalítica de la variable soluble de LipA frente a cambios de pH y temperatura.....	38
5. Discusión.....	40
6. Conclusiones	46
Referencias bibliográficas.....	48

Lista de Tablas

Tabla 1. <i>Accesibilidad al solvente de las posiciones hidrofóbicas mutadas de Sm_LipA</i>	43
---	----

Lista de Figuras

<i>Figura 1.</i> Reacción de transesterificación para la síntesis de FAEE	18
<i>Figura 2.</i> Imagen estereoscópica de la estructura cristalina de la lipasa LipA de <i>Serratia marcescens</i> (PDB: 2qua).....	21
<i>Figura 3.</i> Estructura primaria del mutante M1 alineado con el tipo salvaje (WT, código PDB 2qua).....	23
<i>Figura 4.</i> Representación en 3D de la superficie de la lipasa Sm_LipA.....	24
<i>Figura 5.</i> Cálculo de la actividad específica para la hidrólisis del <i>p</i> -nitrofenil butirato (<i>p</i> NPB)..	27
<i>Figura 6.</i> Traducción del gen mutante <i>Sm_LipA_M1</i>	28
<i>Figura 7.</i> Mapa del plásmido recombinante pET_Sm_LipA_M1.....	29
<i>Figura 8.</i> Análisis de restricción del plásmido recombinante pET_Sm_LipA_M1.....	31
<i>Figura 9.</i> Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformada con el vector pET_Sm_LipA_M1.....	32
<i>Figura 10.</i> Formación de cuerpos de inclusión por insolubilidad de Sm_LipA_M1 recombinante	33
<i>Figura 11.</i> Localización subcelular de la proteína Sm_LipA_M1.....	34
<i>Figura 12.</i> Sobreexpresión de Sm_LipA_M1.....	35
<i>Figura 13.</i> Actividad específica de extractos crudos de Sm_LipA_M1 recombinante.....	37
<i>Figura 14.</i> Efecto del pH sobre la actividad hidrolasa de la lipasa mutante Sm_LipA_M1.....	38
<i>Figura 15.</i> Efecto de la temperatura sobre la actividad relativa de la lipasa mutante Sm_LipA_M1.....	39
<i>Figura 16.</i> Análisis de los aminoácidos hidrofóbicos de superficie.....	42

Figura 17. Localización de las mutaciones con respecto al sitio activo.....44

Figura 18. Gráficas de energía potencial de superficie.....45

RESUMEN

TÍTULO: EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA LIPASA LipA DE *Serratia marcescens* EN *Escherichia coli* BL21 (DE3): USO DE UNA VARIANTE SOLUBLE PARA LA TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE PALMA AFRICANA CON ETANOL (BIODIÉSEL)

AUTOR: JENNY PAOLA DÍAZ LANDÍNEZ^{1,2}

PALABRAS CLAVE: BIOTECNOLOGÍA, LIPASA, HIDROLASA, PNPB, DISEÑO RACIONAL, BIODIÉSEL.

DESCRIPCIÓN:

En Colombia, una solución económica a la fabricación industrial de biodiésel, por vía enzimática, consiste en producir localmente lipasas a bajo costo. Previamente el laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología demostró que la lipasa LipA de *Serratia marcescens* (Sm_LipA) posee un potencial en la producción de biodiésel. Sin embargo, por su hidrofobicidad, LipA forma cuerpos de inclusión al sobreexpresarla en *Escherichia coli*. En un macroproyecto del CINBIN, el cual tenía como objetivo diseñar y evaluar *in vitro* versiones solubles de Sm_LipA, los investigadores concibieron el mutante Sm_LipA_M1, mediante herramientas bioinformáticas. Esta isoforma preveía seis sustituciones de aminoácidos polares o hidrofóbicos por (Glu): I56E, L59E, T119E, I310E, W462E y L463E. Además, según la literatura científica, el mismo diseño incluía una delección del dominio β -sandwich ($\Delta 133$) en la región C-Terminal. En este trabajo de grado, se sobreexpresó el gen *Sm_LipA_M1* en *E. coli* BL21 (DE3) y se probó la actividad catalítica de la proteína recombinante. Se sintetizó gen mutante y se clonó en el vector pET-22b. Células de *E. coli* BL21 (DE3) fueron transformadas con el plásmido pET_Sm_LipA_M1 y la expresión se indujo con IPTG. Los resultados mostraron que la proteína Sm_LipA_M1 se localizó como cuerpos de inclusión en las fracciones periplasmática y citoplasmática insoluble. Pruebas de actividad hidrolasa con *p*-nitrofenil butirato (*p*NPB) como sustrato, a pH y temperatura optimizados, mostraron una actividad específica que no pudo superar 1 U/mg de extractos crudos de *E. coli*. Este valor contrasta drásticamente con la actividad específica del tipo salvaje Sm_LipA, sobreexpresada en *E. coli* (12 U/mg). Se consideró injustificado avanzar hacia la evaluación de la actividad aciltransesterasa, como estaba previsto en el cuarto objetivo general. Se concluyó que las mutaciones impactaron negativamente la estabilidad de la enzima y en la discusión se argumentan las probables fallas en el diseño de Sm_LipA_M1.

¹Trabajo de grado

²Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Jorge Hernández Torres, Ph.D.

ABSTRACT

TITLE: HETEROLOGOUS EXPRESSION OF LIPASE LipA FROM *Serratia marcescens* IN *Escherichia coli* BL21 (DE3): USE OF A SOLUBLE VARIANT FOR THE ENZYMATIC TRANSESTERIFICATION OF AFRICAN PALM OIL WITH ETHANOL (BIODIESEL)

AUTHOR: JENNY PAOLA DÍAZ LANDINEZ^{1,2}

KEYWORDS: BIOTECHNOLOGY, LIPASE, HYDROLASE, PNPB, RATIONAL DESIGN, BIODIESEL

DESCRIPTION:

An economic solution to the Colombia industrial manufacture of biodiesel, by enzymatic means, consists of locally produced lipases at a low cost. Previously, the Molecular Biology laboratory of the School of Biology demonstrated that the lipase LipA from *Serratia marcescens* (Sm_LipA) has a strong potential in the production of biodiesel. However, due to its hydrophobicity, Sm_LipA forms inclusion bodies when overexpressed in *Escherichia coli*. In the context of a macroproject of CINBIN, which aimed to design and evaluate in vitro soluble versions of Sm_LipA, researchers conceived the Sm_LipA_M1 mutant, through bioinformatics tools. This isoform predicted six substitutions of polar or hydrophobic amino acids by Glu: I56E, L59E, T119E, I310E, W462E and L463E. In addition, based on scientific literature, the rational design included a deletion of the β -sandwich domain (Δ 133) located at C- terminal. In this work, the Sm_LipA_M1 gene was overexpressed in *E. coli* BL21 (DE3) and the catalytic activity of the recombinant protein was tested. A mutant *Sm_LipA_M1* gene was purchased and was cloned into the vector pET-22b. *E. coli* BL21 (DE3) cells were transformed with plasmid pET_Sm_LipA_M1 and expression was induced by IPTG. The results showed that the Sm_LipA_M1 protein was in the periplasmic and insoluble cytoplasmic fractions as inclusion bodies. Tests of hydrolase activity with *p*-nitrophenyl butyrate (*p*NPB) as substrate, at optimized pH and temperature, showed a specific activity that could not exceed 1 U/mg of crude *E. coli* extracts. This value contrasts drastically with the specific activity of the wild type Sm_LipA, when overexpressed in *E. coli* (12 U/mg). It was considered unjustified to undertake the evaluation of acyltransferase activity as expected in the fourth general objective. It was concluded that the mutations negatively impacted the stability of the enzyme; in the discussion some the probable design mistakes of Sm_LipA_M1 are argued.

¹ Undergraduate Thesis

² Science Faculty. School of Biology. Director: PhD, Jorge Hernández Torres

Introducción

El biodiésel, o mezcla de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos (ésteres metílico y etílico), ha ido consolidándose como una fuente de energía alternativa. El carácter renovable, la reducción de la emisión de contaminantes y su aplicación sin modificación en motores de ignición por compresión, estimulan la expansión de su producción (Tan *et al.*, 2012; Tesfa *et al.*, 2013). En vista de la tendencia al incremento en la producción de biocombustibles en Colombia, esta industria apunta a convertirse en un sistema energético propio sobre un marco industrial sostenible (Delgado *et al.*, 2015).

La producción de biodiésel con lipasas ofrece soluciones a los problemas de contaminación que enfrentan los métodos químicos de transesterificación. No obstante, importar lipasas en Colombia resulta costoso (US \$1.000/kg). Una solución para reducir costos es la producción local de enzimas recombinantes en hospederos bacterianos, pues ofrece ventajas como: 1) Transesterificación de materias primas con alta acidez sin producir jabón; 2) presentan una selectividad alta hacia los sustratos y operan en condiciones de reacción de baja energía; y 3) permiten una recuperación más fácil del producto (Fjerbaek *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2017).

Entre las enzimas de referencia más eficientes en la producción de biodiesel está la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) (Hernández *et al.*, 2011). No obstante, esta lipasa debe expresarse en sistemas eucariotas porque requiere de modificaciones postraduccionales, *e.g.*, glicosilación (Larsen *et al.*, 2008). LipA de *Serratia marcescens* presenta 27% de identidad de secuencia con CALB y un RMSD de 4.09 Å; ambas han sido clasificadas como lipasas de tipo triacilglicerol acilhidrolasa, código EC. 3.1.1.3, según los números de la *Enzyme Commission numbers*. Por esta

razón, LipA es actualmente considerada una excelente candidata para la producción de biodiésel (Su *et al.*, 2015; García-Silvera *et al.*, 2018). No obstante, hay que superar los problemas de solubilidad de la enzima, la cual es extremadamente hidrofóbica y forma cuerpos de inclusión al sobreexpresarla en *E. coli*.

En el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología, se logró demostrar la capacidad de LipA de *Serratia marcescens* (Sm_LipA) para llevar a cabo reacciones de transesterificación, utilizando como sustrato aceite vegetal de palma africana (*Elaeis guineensis*) y etanol (Barraza *et al.*, 2016). Los resultados mostraron un rendimiento de 46,5% para la producción de etil ésteres de cadena larga (*Fatty Acid Ethyl Esters*, FAEE). Sin embargo, la proteína presenta problemas de solubilidad al ser expresada en *E. coli* BL21 (DE3), donde forma cuerpos de inclusión (Li *et al.*, 2011; Su, 2015; Barraza *et al.*, 2016).

Como parte de las actividades previstas en el marco del proyecto de investigación titulado “Evaluación de la transesterificación enzimática del aceite de palma africana con etanol (biodiesel), usando extractos crudos de *Escherichia coli* BL21 (DE3), transformada con genes mutantes derivados del diseño racional de formas solubles de dos lipasas bacterianas”, se tenía como objetivo diseñar y evaluar *in vitro* al menos una versión soluble de Sm_LipA y otras lipasas. Es en el marco de ese macroproyecto que se inscribe el presente trabajo de grado.

Los investigadores encargados del diseño racional de los mutantes concibieron, mediante el uso de herramientas bioinformáticas, el mutante Sm_LipA_M1. Esta isoforma preveía seis sustituciones de aminoácidos apolares o hidrofóbicos por un residuo con carga negativa (Glu): I56E, L59E, T119E, I310E, W462E y L463E. Además, en la literatura científica se había reportado que la delección del dominio β -sandwich (Δ 128), situado en la región C-Terminal, mejoraba la actividad sin comprometer la estabilidad de la enzima (Mohammadi *et al.* 2015). Por esta razón,

se incluyó esta reducción de 614 aminoácidos del tipo salvaje a 481, en el diseño de un mutante soluble ideal.

En este sentido, este trabajo de grado busca conocer si las mutaciones de Sm_LipA_M1 evitan la formación de cuerpos de inclusión en *E. coli*, manteniendo la actividad aciltransferasa de la lipasa. Por tanto, nos formulamos la siguiente pregunta de investigación: ¿Pueden las mutaciones de Sm_LipA_M1 evitar la formación de cuerpos de inclusión en *E. coli*, manteniendo la actividad aciltransferasa? Para comenzar, se contrató la síntesis química del gen mutante (Epoch Life Science Inc.), el cual fue clonado en el vector pET-22b. Posteriormente, se transformaron células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) y se indujo la expresión recombinante de la proteína Sm_LipA_M1. Se puso a prueba la actividad catalítica de la proteína recombinante con extractos crudos de *E. coli*, tal como se llevó a cabo con el tipo salvaje (Barraza *et al.*, 2016). Los experimentos se centraron en pruebas de actividad hidrolasa con *p*-nitrofenil butirato (*p*NPB) como sustrato y la optimización de la reacción a diferentes valores de pH y temperatura. Los resultados mostraron una actividad específica muy por debajo del tipo salvaje (8,3%), la cual no se logró superar a pesar de los múltiples ensayos. También se observó que, contrario a lo esperado, Sm_LipA_M1 se mantuvo en la fracción insoluble de *E. coli* (citoplasma y periplasma).

Tomados en conjunto los resultados, se concluyó que hubo fallas en el diseño de Sm_LipA_M1 y que se deben concebir nuevos mutantes teniendo en cuenta esta experiencia como referente. De igual manera, los resultados negativos sirvieron de soporte para tomar la decisión de no adelantar los ensayos de transesterificación, de por sí muy costosos, por implicar pruebas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN- ^1H). En la discusión se argumentan los probables errores de diseño para que sean tenidos en cuenta en el futuro.

1. Objetivos

1.1 General

Evaluar la actividad aciltransferasa de extractos crudos de *Escherichia coli* BL21(DE3) transformada con un mutante del gen LipA (Sm_LipA_M1) que codifica una variable soluble de la lipasa de *Serratia marcescens*, concebida mediante diseño racional.

1.2 Específicos

- Sobreexpresar la lipasa soluble de *S. marcescens* en *E. coli* BL21 (DE3).
- Determinar la actividad hidrolasa de extractos crudos de la lipasa recombinante, frente al *p*-nitrofenil butirato (*p*NPB).
- Estimar la variación de la actividad catalítica de LipA mutante frente a cambios de pH y temperatura.
- Evaluar la actividad aciltransesterasa de extractos crudos de Sm_LipA_M1 mediante el monitoreo de FAEE por RMN-¹H

2. Marco teórico

2.1 Biodiésel

De acuerdo con la *International Association for Testing and Materials* (ASTM), el biocombustible se define como una mezcla de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos (Mishra & Goswami, 2017), derivados de aceites vegetales renovables (soya, maíz, girasol, palma africana, maní, etc.), grasa animal (sebo vacuno, manteca de cerdo, etc.), aceite de cocina usado y algas (Cyglar & Schrag, 1997; Srivastava & Prasad, 2000; Mishra & Goswami, 2017). El problema principal, asociado con el uso de aceites vegetales puros en los motores de combustible diésel, radica en su alta viscosidad, baja volatilidad y carácter poliinsaturado (Srivastava & Prasad, 2000; Balat, 2007). Por esta razón, existen tres procesos principales para intentar superar estos inconvenientes: pirólisis, microemulsificación y transesterificación (Xu *et al.*, 2002).

2.1.1 Pirólisis. La pirólisis o craqueo térmico es un tipo de transformación química de los triacilglicerolos (TAG) a alquenos, alcadienos, aromáticos y ácidos carboxílicos, por la aplicación de energía térmica en presencia de un catalizador y en la ausencia de aire o nitrógeno (Mishra & Goswami, 2017). No obstante, el equipamiento es costoso y poco amigable con el medio ambiente (Parawira, 2010).

2.1.2 Microemulsificación. Es la solución potencial a la viscosidad de los aceites vegetales, por medio de la mezcla de un éster con un codisolvente o aceite vegetal, alcohol, surfactante y mejoradores de cetano, con o sin combustible diésel (Mishra & Goswami, 2017). Sin embargo, el uso continuo de diésel microemulsionado genera problemas en el inyector de aguja,

combustión incompleta y formación de depósitos de carbono (Parawira, 2010).

2.1.3 Transesterificación. La transesterificación o alcoholólisis es el método más popular para la producción de biodiésel. Éste consiste en hacer reaccionar un TAG con un alcohol, para intercambiar el grupo hidroxilo —OH del ácido graso por el grupo $\text{—OCH}_2\text{CH}_3$ (ó —OCH_3) del alcohol, para formar ésteres metílicos y etílicos de ácidos grasos (*Fatty Acid Methyl Ester*, FAME / *Fatty Acid Ethyl Ester*, FAEE), a través de una serie de reacciones consecutivas reversibles. En este proceso, los TAG se convierten en diacilgliceroles (DAG), monoacilgliceroles (MAG) y por último en glicerol (Castellar *et al.* 2014).

En la figura 1 se representa la reacción general de transesterificación para la síntesis de FAEE y glicerol. Este sistema puede utilizar catalizadores ácidos (H_2SO_4 , H_2SO_3), alcalinos (NaOH , KOH , CaO) y lipasas (Parawira, 2010; Soltani *et al.*, 2015). No obstante, la transesterificación alcalina es vulnerable a reacciones de saponificación, por lo que se pierden grandes cantidades de materia prima. Por otro lado, aunque el uso de compuestos ácidos presenta un rendimiento de producción alto (95%) sin ser vulnerable a la saponificación, este método eleva los tiempos de reacción y costos de mantenimiento, como también las relaciones altas del alcohol (Fukuda *et al.*, 2001).

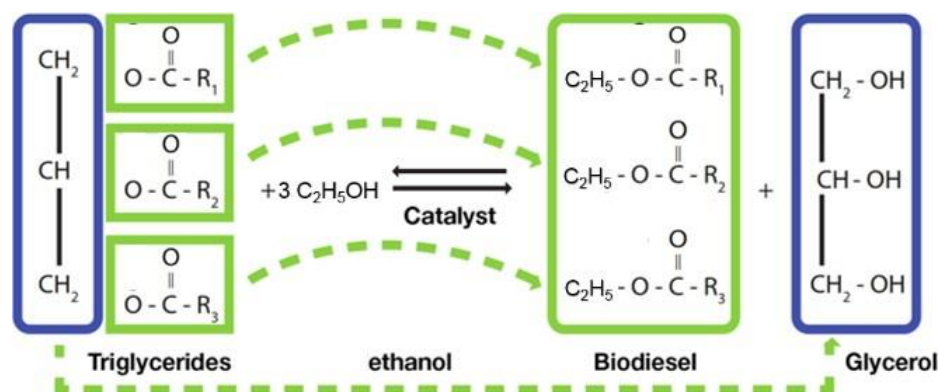


Figura 1. Reacción de transesterificación para la síntesis de FAEE. Adaptado de Burgess, C. (2018). *The reaction of biodiesel*. Recuperado de <https://www.eeducation.psu.edu/egee439/node/684>

Pese a los buenos resultados que exhibe la catálisis química en reacciones de transesterificación, la implementación de estos métodos presenta algunas dificultades: 1) la necesidad de purificar los ésteres; 2) elevado costo de los equipos; y 3) producción de desechos nocivos para el medio ambiente y fuentes hídricas (Benjumea *et al.*, 2004; Sharma, 2015). Lo anterior, ha llevado al desarrollo de procesos catalizados por enzimas, que se caracterizan por ser ambientalmente amigables y ventajosas respecto a la purificación del FAEE.

2.2 Lipasas y su relación con el biodiésel

Las lipasas verdaderas o carboxilesterasas (EC 3.1.1.3), catalizan una amplia gama de reacciones químicas, entre las cuales se destacan la hidrólisis, aminólisis, la interestificación y la transesterificación (Sharma *et al.*, 2001; Jaeger & Eggert, 2002). A diferencia de las esterasas, las lipasas trabajan en fase acuosa y no acuosa (*i.e.*, orgánica). Aunque son producidas por animales, plantas, bacterias y hongos, sólo las lipasas de origen microbiano han sido comercialmente significativas, por su alto rendimiento, bajo costo de producción y diversidad catalítica. Adicionalmente, las lipasas son estables en solventes orgánicos, presentan diversidad de sustratos, generalmente no requieren cofactores (Gupta *et al.*, 2004; Treichel *et al.*, 2010) y presentan una regio- enantioselectividad alta en la aplicación industrial y farmacéutica (Reetz & Jaeger, 2000).

La estructura general de las lipasas se ha logrado resolver a través de la cristalografía de rayos X. Éstas se caracterizan por presentar una configuración general α/β hidrolasa. El sitio activo está constituido por una triada Ser-Asp/Glu-His (Aloulou *et al.*, 2006), con la cual catalizan la hidrólisis de triglicéridos a glicerol y ácidos grasos libres (*Free Fatty Acids*, FFA), en una interfase aceite-agua. Adicionalmente, estas proteínas presentan “activación interfacial”, atribuida a un fragmento

helicoidal de una o dos α - hélices cortas conocida como “tapadera” (“*lid*” ó “*flat*”). El *lid* exhibe una conformación cerrada (inactiva), cuando cubre el sitio activo, y abierta (activa), cuando el bucle se mueve exponiendo el sitio activo (Khan *et al.*, 2017).

2.3 La lipasa LipA de *Serratia marcescens*

La lipasa LipA de *S. marcescens* (Sm_LipA) (figura 2) pertenece a la familia I, subfamilia 1.3 de enzimas lipolíticas, en donde se incluyen las lipasas verdaderas de bacterias Gram negativas. A esta familia pertenecen las lipasas de *S. marcescens* y *Pseudomonas fluorescens*, las cuales comparten 56-66% de identidad y son secretadas por el sistema de secreción tipo I (*Type-1 secretion system*, T1SS).

Se caracterizan por no poseer residuos de cisteína y carecen de una secuencia señal N-terminal. Sm_LipA consta de 614 aminoácidos (64-65 kDa); contiene entre 12 y 14 repeticiones en tándem de un motivo rico en glicina, alojadas en dos bloques (residuos 369-418 y 489-564), El motivo contiene nueve aminoácidos de unión al calcio y una secuencia señal putativa llamada motivo RTX (*repeats in toxin*), cerca de la región C- Terminal (Angkawidjaja *et al.*, 2005; Angkawidjaja & Kanaya, 2006).

Se estima que la enzima tiene 30% de aminoácidos hidrofóbicos, lo cual la hace insoluble (Long *et al.*, 2007) y formadora de cuerpos de inclusión (CE), cuando se sobreexpresa en *E. coli*. Los CE están formados por polipéptidos que interactúan de manera cruzada a través de contactos esteroespecíficos y se depositan de manera constante en el citoplasma de la célula o en el periplasma (García *et al.*, 2011). El punto isoelectrico (pI) se calcula entre 4,3 y 4,6; la actividad hidrolasa es mayor a valores de pH y temperatura de 8 y 42 °C, respectivamente (Abdou, 2003, Mohammadi *et al.*, 2015). Los residuos Ser207, Asp256 e His314 conforman la triada catalítica.

2.4 Ingeniería genética para la biocatálisis mejorada

La producción de biodiesel catalizada por lipasas alberga un gran potencial energético y eco-amigable. No obstante, debido al alto costo de adquisición de las enzimas, se ha sugerido el uso de la tecnología de ADN recombinante y métodos de mutagénesis dirigida, con el fin de hacer más rentable su utilización en la industria (Bajaj *et al.*, 2010). El diseño racional de proteínas se basa en el conocimiento previo de la estructura y el mecanismo de función de una proteína. Junto con la mutagénesis dirigida, hacen posible mejorar las lipasas *in silico*, antes de expresarlas de manera recombinante (Bornscheuer & Pohl, 2001; Chen, 2001). De esta manera, se construyen enzimas,

por ejemplo, con mayor solubilidad, estabilidad o afinidad por el sustrato.

2.5 Diseño de la proteína Sm_LipA_M1

La isoforma mutante soluble de Sm_LipA fue diseñada por los biólogos Jeffersson Orlando Bautista Villabona y Andrés Arturo Luque Díaz, en el marco del macroproyecto financiado por la Dirección de Investigaciones de la Facultad de Ciencias (DIEF) de la UIS, titulado “Evaluación de la transesterificación enzimática del aceite de palma africana con etanol (biodiesel), usando extractos crudos de *Escherichia coli* BL21 (DE3), transformada con genes mutantes derivados del diseño racional de formas solubles de dos lipasas bacterianas”.

Los investigadores concibieron el mutante basándose en la secuencia de código PDB 2qua, mediante el uso de herramientas bioinformáticas tales como Camsol (definición de residuos a mutar) (Sormanni *et al.*, 2015) iTasser (modelización de la estructura mutada) (Zhang, 2008) GROMACs (dinámica molecular) (Van Der Spoel *et al.*, 2005) y Autodock (interacción enzima-ligando) (Trott & Olson, 2010). El gen mutante Sm_LipA_M1 contiene seis sustituciones de aminoácidos polares o hidrofóbicos por un residuo con carga negativa (Glu): I56E, L59E, T119E, I310E, W462E y L463E. De acuerdo con la literatura científica, la delección del dominio β -sandwich (Δ 133), situado en la región C- Terminal, mejora la actividad sin comprometer la estabilidad de la enzima (Mohammadi *et al.* 2015). Por esta razón, se incluyó esta reducción de 614 aminoácidos del tipo salvaje a 481, en el diseño de un mutante soluble ideal (Figura 3).

WT	SHMGIFSFKLDL DENASKALFSDALAISTYAYHNIDNGFDEGYHQTGFGLGLPLTLITLTI	60
M1	--MGIFSFKLDL DENASKALFSDALAISTYAYHNIDNGFDEGYHQTGFGLGLPLTLITLTI	58

WT	GSTQSQGGLPGLPWNPDSEQAQAEAVNNAGWSVISATQLGYAGKTDARGTTYGETAGYTT	120
M1	GSTQSQGGLPGLPWNPDSEQAQAEAVNNAGWSVISATQLGYAGKTDARGTTYGETAGYTT	118

WT	AQAEVLGKYDSEGNLTAIGISFRGTSGPRESLIGDTIGDVINDLLAGFGPKGYADGYTLK	180
M1	AQAEVLGKYDSEGNLTAIGISFRGTSGPRESLIGDTIGDVINDLLAGFGPKGYADGYTLK	178

WT	AFGNLLGDVAKFAQAHGLSGEDVVVSGHSLGGLAVNSMAAQSDANWGGFYAQSNYVAFAS	240
M1	AFGNLLGDVAKFAQAHGLSGEDVVVSGHSLGGLAVNSMAAQSDANWGGFYAQSNYVAFAS	238

WT	PTQYEAGGKVINIGYENDPVFRALDGTSLTLP SLGVHDAPHTSATNNIVNFNDHYASDAW	300
M1	PTQYEAGGKVINIGYENDPVFRALDGTSLTLP SLGVHDAPHTSATNNIVNFNDHYASDAW	298

WT	NLLPFSIILNPTWLSHLPFFYQDGLMRVLNSEFYSLTDKDSIIIVSNLSNVTRGNTWVED	360
M1	NLLPFSIILNPTWLSHLPFFYQDGLMRVLNSEFYSLTDKDSIIIVSNLSNVTRGNTWVED	358

WT	LNRNAETHSGPTFIIGSDGNDLIKGGKNDYLEGRDGDIDFRDAGGYNLIAGGKGNIFD	420
M1	LNRNAETHSGPTFIIGSDGNDLIKGGKNDYLEGRDGDIDFRDAGGYNLIAGGKGNIFD	418

WT	TQQALKNTEVAYDGNTLYLRDAKGGITLADDISTLRSKETSIFNKEVDHQVTAAGLKS	480
M1	TQQALKNTEVAYDGNTLYLRDAKGGITLADDISTLRSKETSIFNKEVDHQVTAAGLKS	478

	↓ Inicio deleción (versión truncada)	
WT	DSGLKAYAAATGGDGDVLQARSHDAWLFGNAGNDTLIGHAGGNLTFVGGSGDDILKGVG	540
M1	D-----	479
	*	
WT	NGNTFLFSGDFGRDQLYGFNASDKLVFIGTEGASGNIRDYATQQNDDLVLAFGHSQVTLI	600
M1	-----	479
WT	GVSLDHISTDQVVLA	615
M1	-----	479

Figura 3. Estructura primaria del mutante M1 alineado con el tipo salvaje (WT, código PDB 2qua).

Se representan en color verde los aminoácidos nativos y en color rojo los residuos Glu mutantes (E). La flecha marca el punto donde termina la región truncada en M1, en donde se añadió una etiqueta de poli-histidina para futura purificación en columna de afinidad.

En la figura 4 se representan gráficamente los cambios aminoacídicos que se hicieron en los residuos hidrofóbicos de superficie de Sm_LipA. Como puede apreciarse, las mutaciones están

orientadas *grosso modo* hacia un plano específico y en la cara opuesta a la región deletada (amarillo).

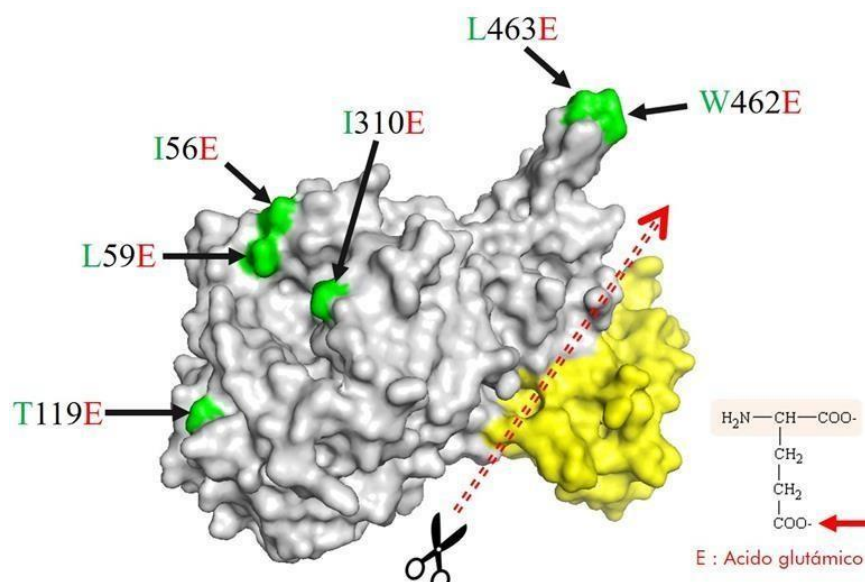


Figura 4. Representación en 3D de la superficie de la lipasa Sm_LipA. Se representa en amarillo la región de la deleción del dominio β -sándwich $\Delta 133$. Se señalan las seis sustituciones por ácido glutámico (Glu): I56E, L59E, T119E, I310E, W462E y L463E

3. Metodología

3.1 Construcción del vector de expresión recombinante

Con base en la secuencia de Sm_LipA se rediseñó un marco de lectura abierto que incluyera las mutaciones solubilizantes (I56E, L59E, T119E, I310E, W462E y L463E). En el gen mutante *Sm_LipA_M1* se añadió un sitio de terminación prematura de la traducción para generar la versión truncada. La síntesis química del gen *Sm_LipA_M1* se contrató con la empresa Epoch Life Science Inc. y el ADN resultante se clonó en el vector de expresión pET-22b, en los sitios de restricción

NcoI y BamHI, para conformar el plásmido recombinante pET_Sm_LipA_M1. La calidad de la construcción fue verificada mediante secuenciación por Macrogen Inc. (Corea).

3.2 Transformación de la cepa hospedera *E. coli* BL21 (DE3)

Células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) fueron transformadas con los plásmidos pET-22b (no recombinante) y pET_Sm_LipA_M1, por medio de choque térmico en presencia de 0,1 M CaCl₂. La correcta transformación de las cepas fue corroborada con extracciones de ADN de plásmido en pequeña cantidad y análisis de restricción con las enzimas de clonación *NcoI* y *BamHI*. Las cepas fueron criopreservadas según el protocolo propuesto por Sambrook y Russell (2001) y almacenadas en el cepario del Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología.

3.3 Inducción de la expresión de Sm_LipA_M1 con IPTG

La sobreexpresión del plásmido recombinante pET_Sm_LipA_M1 en *E. coli* se realizó en 100 mL de medio cultivo SOB pH 7, suplementado con 100 µg/mL de ampicilina e incubado a 150 rpm y 37 °C. El crecimiento bacteriano fue monitoreado a 600 nm. Cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica de 600 nm (DO₆₀₀) entre 1,4 -1,9 se indujo la expresión del gen recombinante con 1 mM IPTG.

Fracciones de medio de cultivo (FM), del periplasma (FP) y citoplasmática (soluble, FCS e insoluble, FCI) fueron extraídas, luego de 0, 1 y 3 h de inducción. En todas las fracciones se monitoreó la actividad hidrolítica. Adicionalmente, se realizaron visualizaciones microscópicas de las células para constatar la presencia de cuerpos de inclusión. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

3.3.1 Visualización mediante electroforesis SDS-PAGE. Los extractos de proteína fueron observados según el Sistema Laemmli mediante electroforesis en gel 12 % poliacrilamida (SDS-PAGE), teñidos con 0,1 % AgNO₃ según el protocolo de Chevallet *et al.* (2006).

3.3.2 Determinación de la concentración de proteínas por ensayo de Bradford. Las proteínas obtenidas fueron cuantificadas por el método colorimétrico de Bradford con un máximo de absorción de 595 nm. Se utilizó Albúmina de Suero Bovino (BSA) como proteína patrón, disuelta en 20 mM Tris-HCl pH 8.0, utilizando un rango de concentraciones de 0 a 0.4 mg/mL. Las lecturas de absorbancia se realizaron 3 min después de haber adicionado 2 mL de agente colorante a 50 µL de muestra.

3.3.3 Determinación de la actividad hidrolítica del mutante Sm_LipA_M1 frente a *p*-nitrofenil butirato (pNPB). La actividad hidrolítica de los extractos crudos se cuantificó por espectrofotometría, midiendo el incremento de la absorbancia del *p*-nitrofenol según su punto isobéptico a 348 nm. Debido a que Sm_LipA_M1 forma cuerpos de inclusión en el hospedero, la proteína se solubilizó con 1.6 M urea y posteriormente se reconstituyó con 8 mM CaCl₂, según el protocolo propuesto por Barraza (2016). Seguidamente se establecieron las siguientes condiciones: 3 min de registro, 0.4 mM *p*-nitrofenil butirato (pNPB), en 25mM buffer a pH 5-9. La reacción comenzó con la disolución de 50 µL de extracto crudo en 850 µL de buffer con 100 µL de sustrato. La unidad internacional de actividad (U) es definida como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 µmol de pNPB por min bajo las condiciones establecidas. La actividad específica para la hidrólisis del pNPB fue calculada con esta fórmula (Figura 5):

$$\text{Actividad específica (U/mg)} = m \frac{10^6}{\epsilon_{348}} * \frac{V_t}{V_m} * \frac{FD}{C_{prot}} * \frac{1 l}{1000 ml}$$

Donde:

m = pendiente (min^{-1})

ϵ_{348} = coeficiente de extinción molar del *p*-nitrofenol ($5150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) V_t = Volumen total de la reacción (μL)

V_m = Volumen de la solución enzimática (μL) FD = Factor de dilución enzimático

C_{prot} = concentración de proteína en la solución enzimática (mg/mL)

U = cantidad de enzima necesaria para hidrolizar un μmol de *p*NPB en 1 min.

Figura 5. Cálculo de la actividad específica para la hidrólisis del *p*-nitrofenil butirato (*p*NPB)

3.4 Actividad catalítica de la variable soluble de LipA frente a cambios de pH y temperatura.

Para evaluar los efectos de cada variable sobre la actividad hidrolasa del mutante, se analizó por medio de espectrofotometría la hidrólisis de 4 mM *p*NPB (348 nm) con extractos crudos solubilizados y reconstituidos de *E. coli* BL21 (DE3), transformada con pET_Sm_LipA_M1.

Los ensayos se realizaron por triplicado así:

3.4.1 pH. El pH más favorable para Sm_LipA_M1 se midió por medio de la variación de la actividad después de ser incubada por 20 minutos a diferentes soluciones de pH (25 mM buffer acetato de potasio, pH 5; buffer sodio-fosfato, pH 6; buffer Tris-HCl, pH 7-8; buffer Tris, pH 9).

3.4.2 Temperatura. El efecto de la temperatura en la proteína Sm_LipA_M1 se monitoreó con la variación de la actividad al modificar la temperatura cada 5 °C en un gradiente de 25 a 50 °C. Las mediciones se realizaron luego de 20 min de incubación.

4. RESULTADOS

4.1 Construcción del vector de expresión recombinante

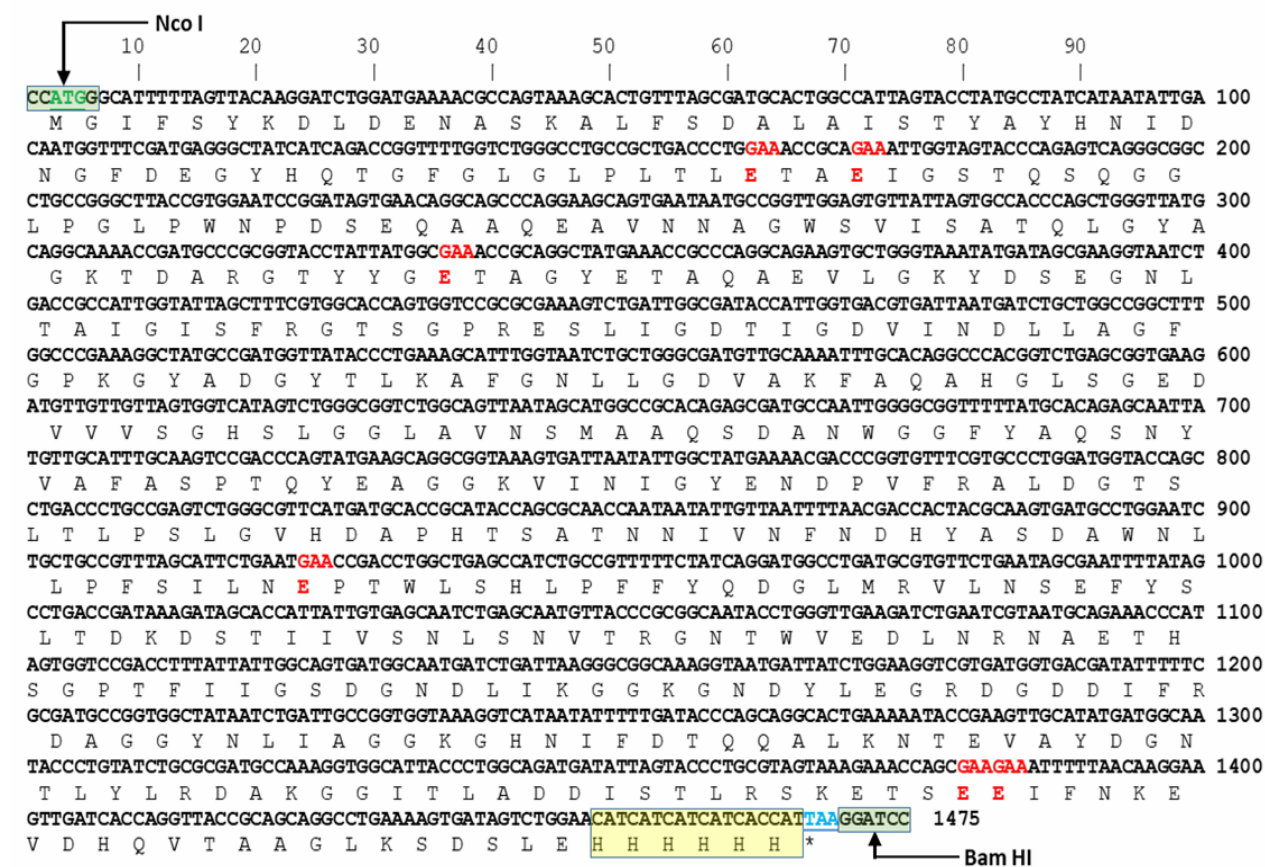


Figura 6. Traducción del gen mutante *Sm_LipA_M1*. Los codones de iniciación y terminación se muestran en verde y celeste, respectivamente. Se señalan con flechas los sitios de restricción Nco I y Bam HI, para clonación en el vector pET-22b. Caja amarilla: poli-histidina. Las posiciones mutadas se destacan en color rojo.

Con base en la estructura primaria del mutante *Sm_LipA_M1* proveído por los investigadores, se procedió a diseñar la secuencia de ADN codificante. Respecto al gen nativo *LipA* de *S. marcescens* (1857 bp), el gen *Sm_LipA_M1* (1.461 bp) codifica para una lipasa de 481 aminoácidos (incluyendo 6 residuos de Histidina

en el extremo C- Terminal) y contiene seis sustituciones de aminoácidos apolares o hidrofóbicos por un residuo con carga negativa (Glu): I56E, L59E, T119E, I310E, W462E y L463E (Figura 6). El peso molecular y el pI de la proteína Sm_LipA_M1 se estimaron en 52.209 Da y 4.60, respectivamente. Por otra parte, toda la cadena codificante se readaptó al uso de codones de *E. coli*, de acuerdo con las tablas de uso de codones alojadas en el NCBI.

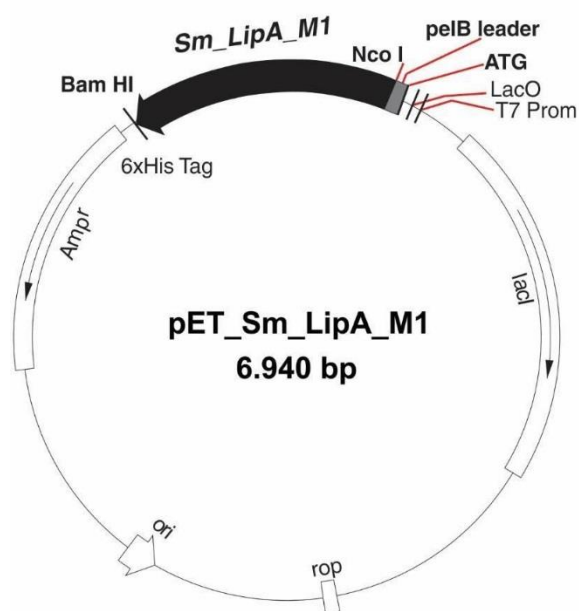


Figura 7. Mapa del plásmido recombinante pET_Sm_LipA_M1. Se representa con la flecha de color negro el gen mutante *Sm_LipA_M1*. Se muestran otros componentes del plásmido: gen de resistencia a la ampicilina (*Amp^r*), el gen *rop*, el gen regulador *lacI* y la secuencia señal *pelB* para la exportación de la proteína al espacio periplasmático.

El gen *Sm_LipA_M1* fue clonado en los sitios de restricción Nco I y Bam HI del vector de expresión pET-22b, constituyendo el plásmido recombinante pET_Sm_LipA_M1 de 6.940 bp (Figura 7). Como puede apreciarse en la figura 7, el gen *Sm_LipA_M1* fue clonado en 3' y en fase con la secuencia líder *pelB* (*pectate lyase* B de *Erwinia carotovora*), con el propósito de dirigir la proteína al periplasma bacteriano. Esta solución ha sido encontrada de utilidad para mejorar la

estabilidad de las enzimas recombinantes y en particular de las lipasas (Georgiou *et al.*, 1986; Berkmen, 2012; Ujiie *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018). Está establecido que la secuencia líder peIB (de 22 aminoácidos) es removida posteriormente a la secreción, por lo que no interfiere con la actividad de la proteína recombinante (Sokolosky & Szoka, 2013). Finalmente, se añadió una cola poli-histidina para purificación futura con columnas de afinidad. Esta adición en el extremo C-Terminal se ha empleado exitosamente con las lipasas y no ha mostrado interferencia con su actividad (De Almeida *et al.*, 2018; Kutysenko *et al.*, 2018).

4.2 Transformación de *E. coli* BL21 (DE3)

Se transformaron células competentes de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) con los plásmidos no recombinante como control (pET-22b) y recombinante (pET_Sm_LipA_M1). Se procedió a realizar extracción de ADN de plásmido y se hizo un corte con las enzimas de restricción de clonación (i.e., Nco I y Bam HI). En la figura 8 se puede apreciar la separación electroforética de los productos de la digestión del plásmido recombinante. El plásmido pET_Sm_LipA_M1 digerido con Nco I y Bam HI arrojó dos bandas de aproximadamente 1.4 (inserto) y 5.4 kb (vector). Los productos esperados son de 1461 y 5493 bp, por lo que se puede concluir que la clonación fue exitosa y que las bacterias fueron debidamente transformadas. Las cepas fueron criopreservadas y registradas en el cepario del Laboratorio. Sin embargo, el plásmido pET_Sm_LipA_M1 fue secuenciado desde los dos extremos de los sitios de clonación y no se encontró ninguna anomalía en la construcción, con respecto al diseño inicial.

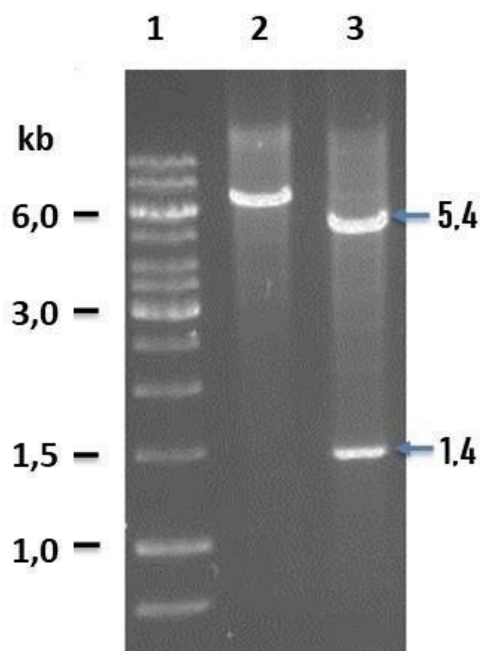


Figura 8. Análisis de restricción del plásmido recombinante pET_Sm_LipA_M1. Carril 1: GeneRuler 1kb (Thermo Scientific™); carril 2: pET_Sm_LipA_M1 no digerido (control); carril 3: pET_Sm_LipA_M1 digerido con Nco I y Bam HI.

4.3 Sobreexpresión de la proteína Sm_LipA_M1

Para dar inicio a las pruebas de expresión, se realizaron curvas de crecimiento de las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con los plásmidos pET-22b (control negativo) y pET_Sm_LipA_M1 (plásmido recombinante), con y sin inducción con IPTG. Se registró la variación de la DO₆₀₀ durante 3 h, cada 30 min, de acuerdo con las experiencias previa adquiridas en la expresión del tipo salvaje de Sm_LipA. En la figura 9 se observan las curvas de crecimiento en cada condición experimental.

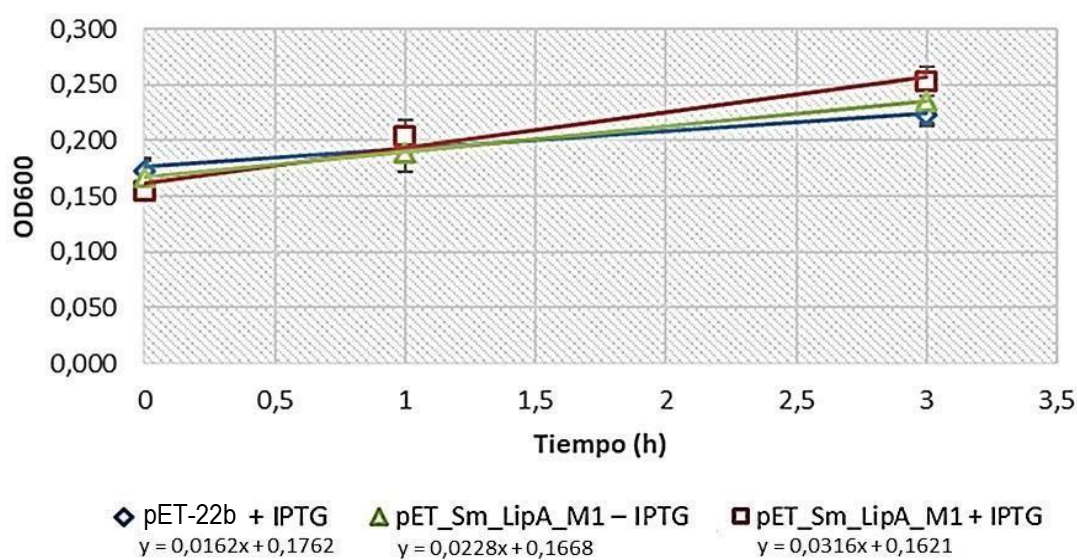


Figura 9. Curva de crecimiento de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el vector pET_Sm_LipA_M1. En azul (♦), pET-22b + IPTG (control negativo); en verde (▲) pET_Sm_LipA_M1 - IPTG (no inducido) y en rojo (■) pET_Sm_LipA_M1 + IPTG (inducido). Factor de dilución: 10X. Las viñetas representan el promedio ($\bar{X}$) de tres mediciones independientes. La tendencia de los datos se señaló por una línea continua.

Como se puede apreciar en la figura 9, el crecimiento de las cepas transformadas es lineal durante el término de 3 h. Las células de mayor crecimiento son las transformadas con el plásmido pET_Sm_LipA_M1 e inducidas con IPTG, con un $\Delta A=1$ respecto al control no recombinante. Este comportamiento ya se había observado durante la expresión del tipo salvaje de Sm_LipA (aunque con un ΔA superior de 2.5) y se atribuyó al hecho de que la enzima recombinante favorece el crecimiento de las células (Barraza *et al.*, 2016). Probablemente, la lipasa contribuye en alguna manera a la metabolización de los nutrientes del medio de cultivo.

Por otra parte, las células con crecimiento medio fueron las transformadas con el vector pET_Sm_LipA_M1, pero no inducidas con IPTG. Aunque solo está ligeramente por encima del control

negativo (pET-22b no recombinante), es interesante que superen en algo al control. Por experiencia en nuestro laboratorio y en la literatura científica, el sistema pET exhibe una expresión basal que escapa a la inducción con IPTG (Grossman *et al.*, 1998). De esta manera, es válido suponer que la expresión basal de Sm_LipA_M1 contribuye en pequeña proporción al metabolismo de las células de *E. coli*. Es necesario precisar que, en el trabajo de Barraza (2016), el ΔA entre el plásmido recombinante no inducido y el control negativo fue de alrededor de 0,6. En cambio, en la figura 9 se aprecia que la diferencia es de más o menos 0,2 unidades de absorbancia. En otras palabras, la contribución de la enzima recombinante al metabolismo de *E. coli* es superior en el caso del tipo salvaje que en el mutante.

Como este proyecto trata sobre la solubilización de una proteína hidrofóbica mediante mutagénesis sitio-dirigida, un experimento de rigor es la verificación de la ausencia de cuerpos de inclusión en *E. coli*. Por esta razón, células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con pET-22b (control), pET_Sm_LipA (vector pET recombinante con el gen *LipA* nativo) y pET_Sm_LipA_M1 (Sm_LipA mutante soluble) fueron cultivadas en medio líquido inducido con IPTG y coloreadas mediante tinción de Gram. En la figura 10 se observa que la proteína Sm_LipA_M1 continúa formando agregados insolubles (regiones oscuras, figura 10B), lo mismo que ocurre con la acumulación citoplasmática de tipo salvaje (Figura 10C).

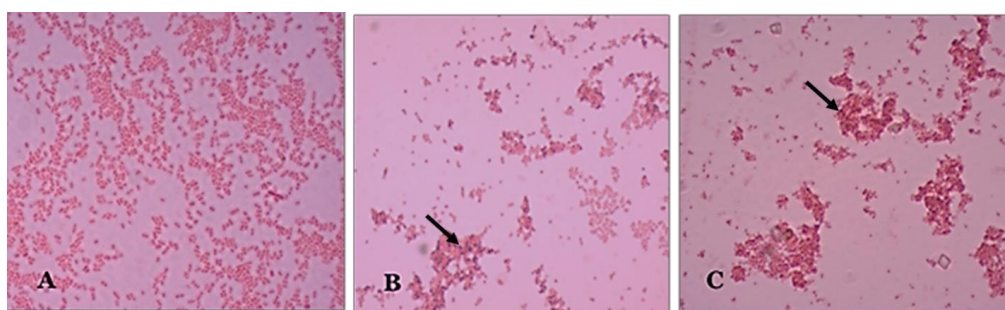


Figura 10. Formación de cuerpos de inclusión por insolubilidad de Sm_LipA_M1 recombinante. Células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas y en cultivo inducido con IPTG fueron coloreadas mediante la tinción de Gram. A) Células transformadas con pET-22b (control), B) Células

transformadas con pET_Sm_LipA_M1. C) Células transformadas con pET_Sm_LipA (*LipA* nativo). Las flechas señalan la acumulación de proteína dentro de *E. coli*, formando cuerpos de inclusión.

Con el fin de aportar más evidencias para apoyar el resultado anterior, se realizó un fraccionamiento de extractos crudos de *E. coli* transformada con pET_Sm_LipA_M1 e inducida con IPTG, en fracciones citoplasmática insoluble (FCI), citoplasmática soluble (FCS), del periplasma (FP), del medio (FM) y proteína total (PT). Posteriormente, se hizo una separación electroforética de las fracciones sobre gel de poliacrilamida (SDS- PAGE). Al mismo tiempo, a cada fracción se le realizaron pruebas de actividad hidrolasa con (pNPB) como sustrato.

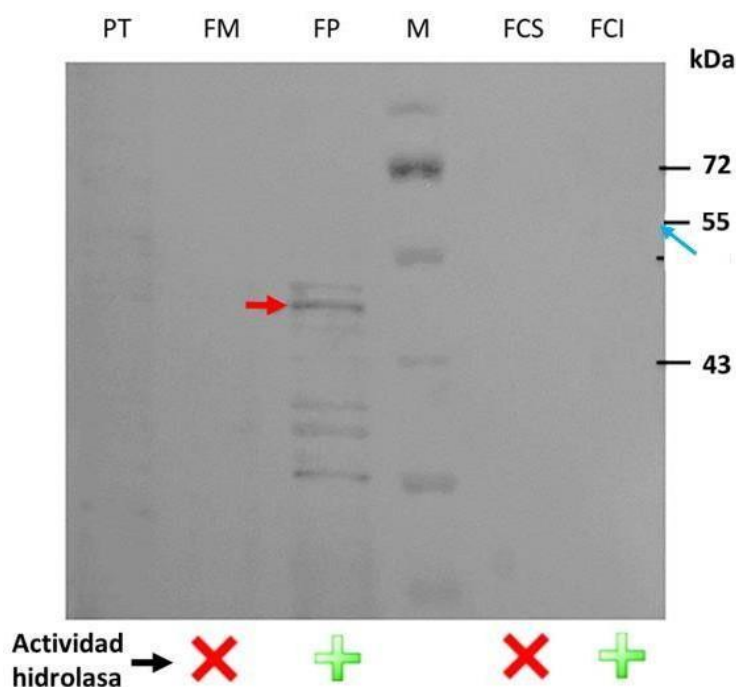


Figura 11. Localización subcelular de la proteína Sm_LipA_M1. SDS-PAGE de extractos celulares de pET_Sm_LipA_M1. Carril PT: proteína total; carril FM: fracción de medio; carril FP: fracción del periplasma, carril M: PageRulerTM #26616; carril FCS: fracción citoplasmática soluble; carril FCI: fracción citoplasmática insoluble. La flecha roja señala una proteína candidata

Sm_LipA_M1 de 52 kDa. La flecha azul señala otra proteína de un peso molecular mayor al esperado (*i.e.*, 55 kDa). Abajo: actividad hidrolítica de la fracción con *p*NPB como sustrato: presente (✚) y ausente (✗).

En la figura 11 se muestra el resultado del gel SDS-PAGE y la actividad hidrolasa detectada para cada fracción. Como puede apreciarse, en la fracción de periplasma (FP) se observa la presencia de una banda alrededor de 52 kDa, compatible con el peso molecular esperado de Sm_LipA_M1 (52,2 kDa). En la fracción citoplasmática insoluble se notó la presencia de una banda apenas visible de ≈ 55 kDa. En ambos casos se detectó actividad hidrolasa frente al *p*NPB, lo cual es un indicador de que Sm_LipA_M1 se asocia con las fracciones insolubles.

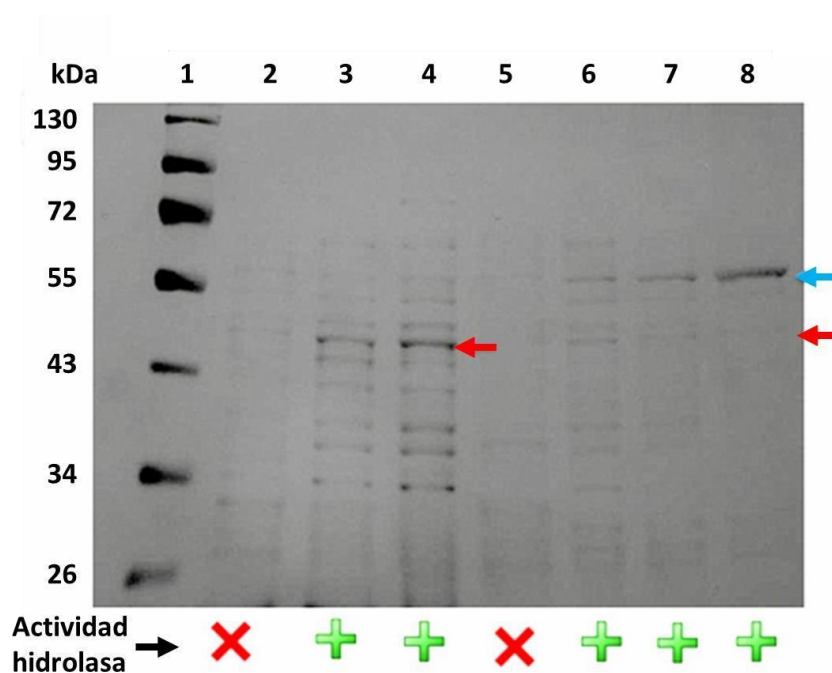


Figura 12. Sobreexpresión de Sm_LipA_M1. SDS-PAGE de extractos de las fracciones periplasma (FP) y citoplasmática insoluble (FCI) de pET_Sm_LipA_M1 + IPTG (1 mM). Carril 1: PageRulerTM #26616; carriles 2-4: expresión de Sm_LipA_M1 de FP a 0 h, 1 h y 3 h de inducción, respectivamente; carril 5: fracción periplasma plásmido no recombinante; carriles 6-8:

expresión de Sm_LipA_M1 de FCI a 0 h, 1 h y 3 h de inducción, respectivamente. Las flechas indican la proteína mutante. Abajo: actividad hidrolítica de Sm_LipA_M1 frente al *pNPB*, presente (✚) y ausente (✖).

En vista de que no contamos con anticuerpos para la detección de Sm_LipA mediante western blot, una forma de constatar que las proteínas candidatas correspondieran con de Sm_LipA_M1 sería realizar un monitoreo de la expresión de proteína recombinante luego de inducir con IPTG. De esta manera, se realizó un cultivo de *E. coli* transformada con pET_Sm_LipA_M1 y se hicieron extractos a 0, 1 y 3 h de inducción. Posteriormente, se hicieron extractos de las fracciones periplasma (FP) y citoplasmática insoluble (FCI) de cada tiempo, y a cada extracto se le practicó la prueba de actividad hidrolasa. Lo que se observó en geles de SDS-PAGE fue que ambas proteínas aumentaron sus niveles celulares a medida que transcurría el tiempo de cultivo (figura 12) y su presencia se correlaciona con la aparición de la actividad hidrolasa sobre *pNPB*. De esta manera se concluyó que muy probablemente la proteína observable de 52 kDa sea Sm_LipA_M1 (flechas rojas), aunque no se descarta que la de 55 kDa (Sm_LipA_M1 aumentada en 2.2 kDa por la secuencia líder *peIB*) pueda ser también la forma soluble de Sm_LipA (flecha azul).

4.4 Actividad hidrolasa de Sm_LipA_M1.

Para iniciar la caracterización de las propiedades catalíticas de Sm_LipA_M1, se inició con la detección de la actividad hidrolasa frente al *pNPB*. Las fracciones FCI y FP —que previamente habían mostrado actividad hidrolítica—, de extractos crudos *E. coli* transformada con pET_Sm_LipA_M1 e inducida con IPTG fueron sometidos a ensayos de actividad enzimática. La actividad fue detectable, pero los valores no se correlacionaban con la cantidad de proteína

añadida, tomando como referencia la experiencia adquirida con la proteína tipo salvaje (Sm_LipA).

Por lo anterior, dado que la proteína continuaba formando agregados hidrofóbicos en forma de cuerpos de inclusión, se procedió a solubilizarlos con 1.6 M urea y posteriormente reconstituir la proteína con 8 mM CaCl₂, de acuerdo con el protocolo propuesto por Barraza (2016). Hecho este procedimiento, se incrementó la actividad hidrolasa de pNPB y se pudieron calcular los valores de actividad específica de los extractos crudos, probando diferentes valores de pH. Se calcularon valores de actividad hidrolasa específica para la fracción del periplasma (0.1 U/mg) y citoplasma insoluble (0.4 U/mg), a pH 8 y 5, respectivamente (figura 13). Estos valores no se compadecen con los valores obtenidos con el tipo salvaje (Sm_LipA) por Barraza (2016) de >12 U/mg, por lo cual se consideraron muy bajos en relación con las expectativas, a pesar de los múltiples ensayos a diferentes condiciones fisicoquímicas.

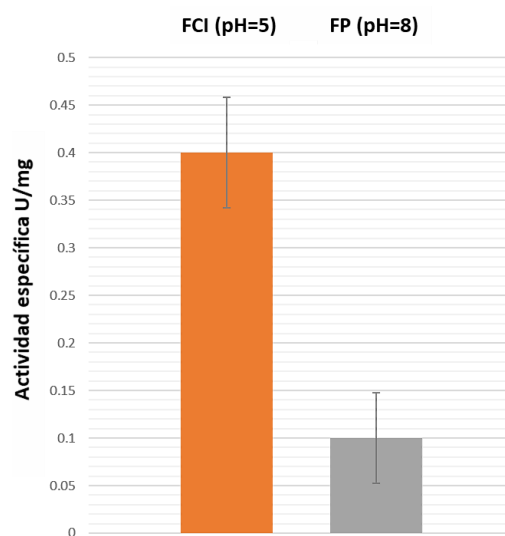


Figura 13. Actividad específica de extractos crudos de Sm_LipA_M1 recombinante. Fracciones FCI (Color naranja) y FP (Color gris) de extractos crudos de *E. coli* transformada con pET_Sm_LipA_M1 + IPTG fueron sometidas a pruebas de actividad hidrolasa frente al pNPB. Los datos representan el $(\bar{X}) \pm SD$ de tres mediciones independientes.

Por otra parte, el marco de lectura abierto había sido clonado frente a la secuencia líder *pelB*, con el propósito de exportar la enzima recombinante hacia el periplasma. Los resultados muestran que una mayor actividad en la fracción citoplasmática insoluble que en el periplasma, indicando una exportación insuficiente. Una de ellas podría ser la insolubilidad de Sm_LipA_M1 y otra la saturación del periplasma en enzima recombinante. Incluso, es probable que la proteína forme cuerpos de inclusión antes de que actúe la maquinaria de exportación.

4.5 Alteración de la actividad catalítica de la variable soluble de LipA frente a cambios de pH y temperatura.

La actividad hidrolasa de Sm_LipA_M1 fue evaluada con *p*NPB como sustrato, bajo un gradiente de pH y temperatura, en busca de las condiciones fisicoquímicas ideales del mutante. Ya que la FP y la FCI fueron las que mostraron actividad hidrolasa, se evaluó la influencia en la actividad de estos dos parámetros, con las dos fracciones.

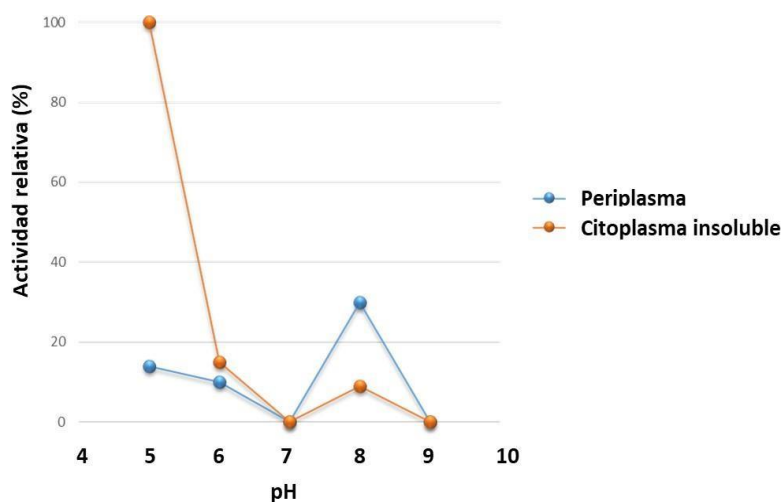


Figura 14. Efecto del pH sobre la actividad hidrolasa de la lipasa mutante Sm_LipA_M1. El ensayo se realizó a 25 °C en un rango de pH de 5 a 9 con *p*NPB como sustrato. La tendencia de los datos se señaló por una línea continua.

En los ensayos de pH, se adoptó un gradiente de 5 a 9 para evitar una hidrólisis química del sustrato. Interesantemente, las fracciones no tuvieron el mismo comportamiento; la FCI exhibió una preferencia por un pH ácido (pH 5), mientras que la FP por un pH ligeramente básico (pH 8). La actividad relativa más alta (100%) ocurrió en la FCI mientras que en la FP la actividad relativa fue de 30% (figura 14).

La otra variable por evaluar fue la temperatura más favorable de reacción. Para estos ensayos, se adoptó una escala entre 25 y 50 °C, con incrementos de 5 °C. Se encontró que, para la FCI y FP, la temperatura ideal fue de 25 °C con 100% de actividad relativa, tanto para FCI a pH 5 (figura 15A) como para FP a pH 8 (figura 15B), respectivamente.

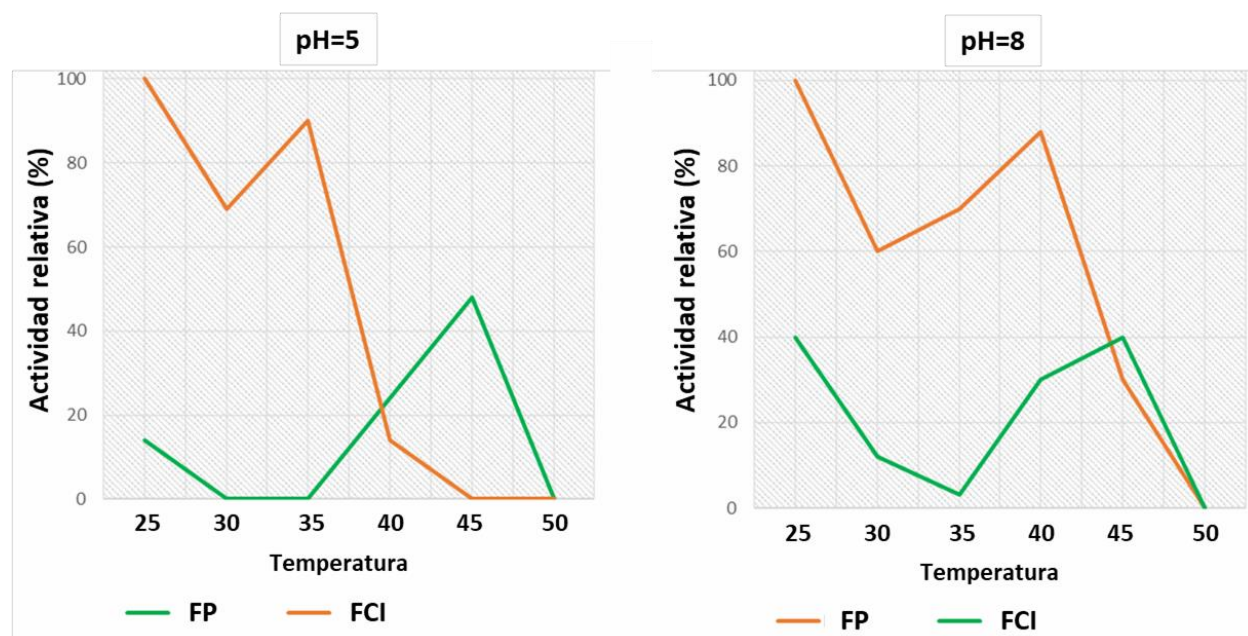


Figura 15. Efecto de la temperatura sobre la actividad relativa de la lipasa mutante Sm_LipA_M1. Cada ensayo fue realizado con *p*NPB como sustrato; el rango de temperatura evaluada fue de 25 a 50 °C. A) Ensayo a pH 5. B) Ensayo a pH 8. La tendencia de los datos se señaló por una línea continua.

El último objetivo específico de este trabajo era el de evaluar la actividad aciltransesterasa de extractos crudos de Sm_LipA_M1 con aceite de palma africana y etanol como sustratos. Como ya se mencionó, en el mejor de los casos la actividad específica de Sm_LipA_M1 apenas alcanza 3,3% de la actividad de Sm_LipA tipo salvaje, estrictamente en las mismas condiciones experimentales. En vista del alto costo de las pruebas del monitoreo de FAEE por RMN-¹H y los bajos valores de actividad hidrolasa, se concluyó improcedente continuar con las pruebas de transesterificación.

5. DISCUSIÓN

La producción de lipasas microbianas para la industria del biodiésel requiere no solo de la sobreexpresión eficiente de las proteínas, sino también de la comprensión detallada de los mecanismos moleculares que gobiernan su plegamiento y funcionamiento. En este trabajo de grado se emprendió la caracterización molecular de un mutante soluble de la lipasa LipA de *Serratia marcescens*. Dicho mutante fue diseñado racionalmente con el propósito de producir una isoforma soluble de Sm_LipA para la producción de biodiésel. En un trabajo previo con el tipo salvaje, se demostró que la enzima es muy eficiente en reacciones de transesterificación (Barraza *et al.*, 2016) pero que formaba cuerpos de inclusión en *E. coli*, un obstáculo ya reportado (Meier *et al.*, 2007; Rueda *et al.*, 2017). Disolver los agregados hidrofóbicos y reconstituir la enzima encarecen los costos de producción. Todo lo anterior aclara el esfuerzo por crear mutantes solubles y funcionales, desde la sobreexpresión misma en un modelo bacteriano.

Esencialmente, la elección errónea del número y posición de los residuos a mutar fueron los aspectos críticos que confluyeron para que Sm_LipA_M1 fuera ineficiente. Sm_LipA_M1 fue

diseñada con la aplicación Camsol, desarrollada para maximizar la solubilidad de una proteína sin comprometer su estructura ni su función (Sormanni *et al.*, 2014). Por qué hubo errores de diseño a pesar de todos los análisis bioinformáticos que se le realizaron al mutante *in silico* es materia de amplia discusión, ya que el plegamiento de una proteína involucra complejos mecanismos fisicoquímicos, cuya explicación escapa a la órbita de este proyecto. No obstante, la figura 16 contiene elementos que no se pueden ignorar y que, al contrario, arrojan algunos indicios. Las figuras 16 A y C representan la superficie de Sm_LipA; para efectos de este trabajo, serán el sentido “recto” (anterior) y “verso” (posterior), respectivamente. Las figuras 16 B y D representan los mismos planos para Sm_LipA_M1, así como 15 E y F lo son para la albúmina de suero de bovino (BSA, código PDB 3v03), tomada como control de una proteína soluble.

Una inspección visual de dichas imágenes revela de inmediato dos conclusiones principales: en primer lugar, resalta la abundancia en los tipos salvaje y mutante, de aminoácidos hidrofóbicos (en verde), respecto al control. Esto ejemplifica de manera gráfica el problema de insolubilidad de la enzima. En segundo lugar y donde creemos que radica toda la problemática, es que una gran concentración de aminoácidos hidrofóbicos en la cara “anterior” (Figura 16 B) forman un parche hidrofóbico particularmente notorio (círculo celeste). Este parche hidrofóbico es tan significativo que 4 de las 6 mutaciones sugeridas por el programa CAMSOL caen en esta región. De esta manera, proponemos que esta cara de Sm_LipA, tanto como de Sm_LipA-M1 son extremadamente hidrofóbicas y son la causa principal de la insolubilidad de la enzima. De hecho, esta región resultó tan hidrofóbica para la aplicación CAMSOL, que propuso cuatro mutaciones, tres de ellas de residuos hidrofóbicos (Ile56, Leu59 e Ile310) y uno polar (Thr119), hacia un aminoácido con carga negativa. Los experimentos demuestran que ni éstas, ni las demás mutaciones fueron suficientes para solubilizar Sm_LipA. Sin duda, nos atrevemos a hipotetizar que el parche hidrofóbico

referido es el principal responsable de la insolubilidad de la enzima

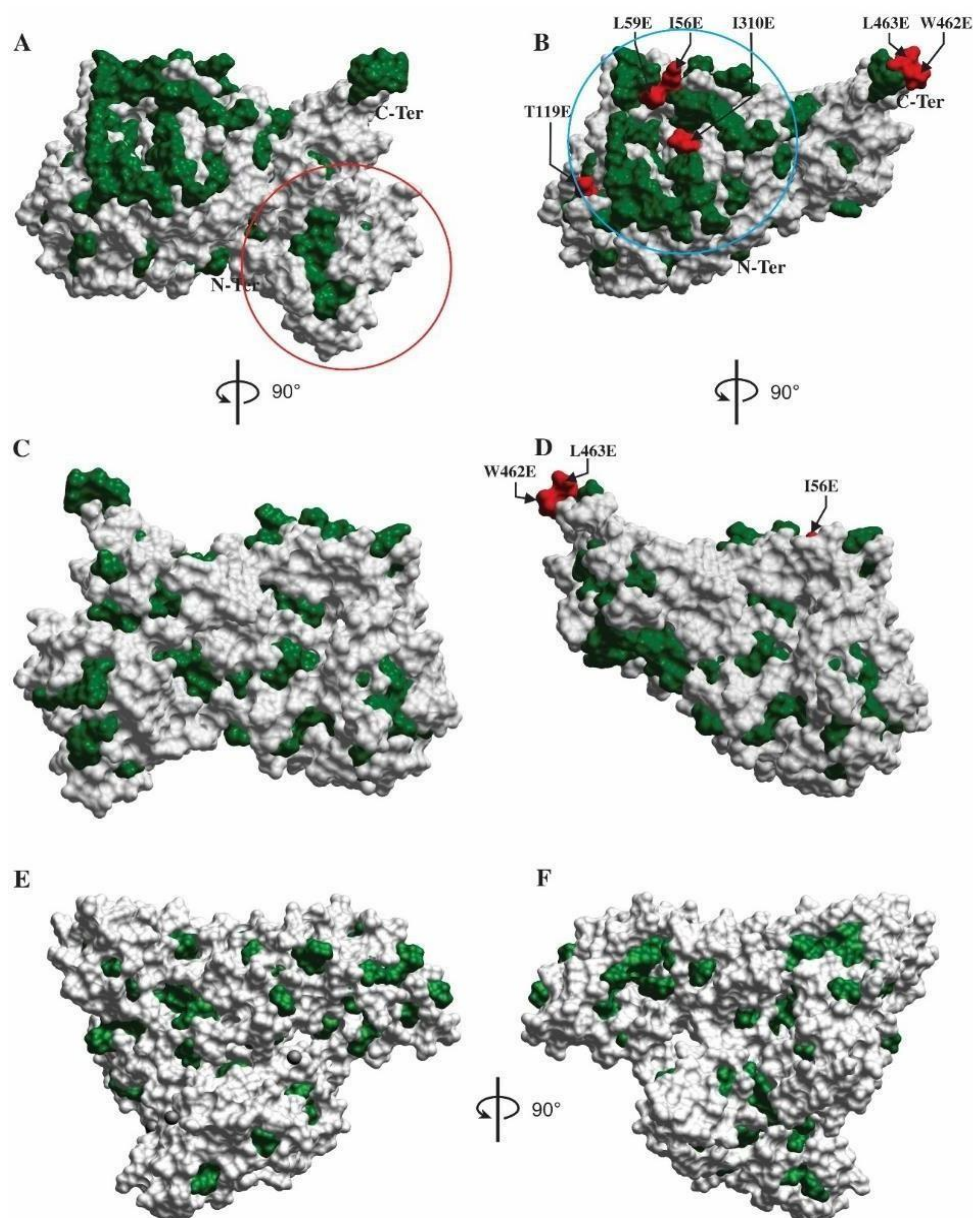


Figura 16. Análisis de los aminoácidos hidrofóbicos de superficie. Modelos 3D de superficie de A) y C) **Sm_LipA** (PDB 2qua), vistas “recto” (R) y “verso” (V), resp. B) y D) **Sm_LipA_M1**, vistas “R” y “V”, resp. E) y F) **BSA** (3v03), vistas “R” y “V”, resp. Los aminoácidos hidrofóbicos se resaltan en verde. Las mutaciones por Glu se muestran en rojo. El círculo rojo en A) representa la región delecionada, i.e., dominio β -sandwich (Δ 133). El círculo azul engloba el parche hidrofóbico.

Sm_LipA y la BSA comparten 30% de residuos hidrofóbicos; sin embargo, la distribución superficial es diferente y este es un factor crucial para la solubilidad (Sweet & Eisenberg, 1983). Cuál y cuántos aminoácidos mutar es una gran pregunta a la hora de diseñar mutantes solubles. Pero es probable que no sea prudente mutar tan drásticamente solo unos pocos residuos de un parche hidrofóbico, sino más bien mutar muchos más, hacia aminoácidos más polares y algunos con carga. Interesantemente, los predictores de solubilidad también muestran dificultad en estimar la solubilidad de Sm-LipA. Por ejemplo, PROSO II (Smialowski et al., 2012) dictamina que Sm_LipA y Sm_LipA_M1 son solubles, con unos índices de solubilidad de 0.686 y 0.720, respectivamente. Protein-Sol (Hebditch *et al.*, 2017) también las considera solubles con unos índices de 0.512 y 0.564, respectivamente, siendo 4.5 el límite inferior. Como la experiencia y la literatura científica lo demuestran, Sm_LipA ha demostrado ser insoluble, por lo cual los cálculos de los predictores están sin duda equivocados. Ya que dichas predicciones se hacen con base en la estructura primaria, es bien probable que los predictores hagan sus estimaciones con base en la fracción de aminoácidos hidrofóbicos sobre aminoácidos totales (30% en Sm_LipA y BSA), sin tener en cuenta la distribución superficial de los mismos.

Tabla 1.

Accesibilidad al solvente de las posiciones hidrofóbicas mutadas de Sm_LipA determinado con el servidor del Center of Informational Biology (CIB) de Japón.

Accesibilidad al solvente [AS]			
Sm_LipA	Relativa (0 - 1)	Sm_LipA_M1	Relativa (0 - 1)
Ile56	0.478	Glu56	0.545
Leu59	0.555	Glu59	0.590
Thr119	0.538	Glu119	0.548
Ile310	0.653	Glu310	0.737
Trp462	0.812	Glu462	0.808
Leu463	0.523	Glu463	0.676

En la Tabla 1 se relaciona la accesibilidad al solvente (Samanta *et al.*, 2002) de los residuos mutados, para el tipo salvaje y el mutante. Como puede concluirse con facilidad, la exposición de dichos residuos (60% en promedio) resulta siendo prácticamente la misma, a pesar de que la cadena lateral de Glu es más larga que las de los mutados. En otras palabras, las cargas negativas quedan sofocadas por la insolubilidad del parche hidrofóbico.

Aparte de la insolubilidad, la pérdida de actividad catalítica fue el segundo problema observado. En principio, no se debe atribuir a la deleción porque, al contrario, se demostró su efecto positivo en la actividad de Sm_LipA (Mohammadi *et al.*, 2015). En cambio, dos factores probables influyeron crucialmente en esta inhibición. Como puede verse en la figura 17, en Sm_LipA (A) el sitio activo está totalmente rodeado de aminoácidos hidrofóbicos y debe ser necesario para la interacción con el sustrato (triglicéridos). Dos residuos de la triada catalítica (Ser207 [AS = 0.461] e His314 [AS= 0.057]) apenas emergen de un sitio activo cubierto por el *lid*, i.e. residuos Ser149-Gly167 (flecha y granulado azules). Asp256 está inmerso en la estructura [AS= 0].

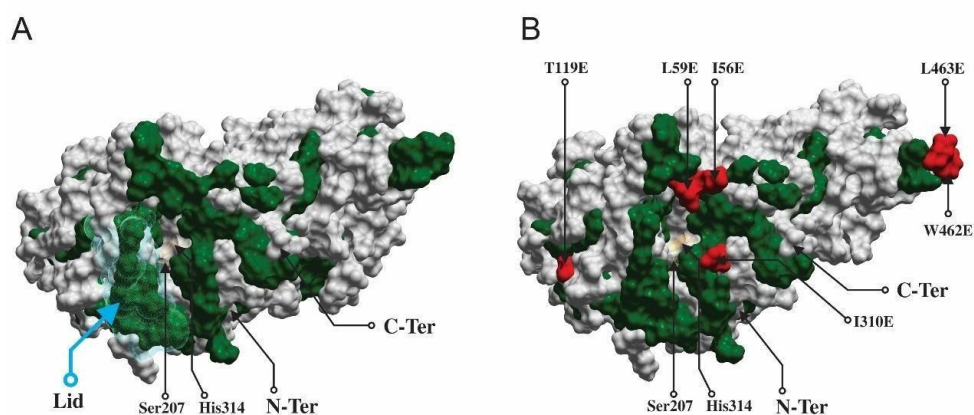


Figura 17. Localización de las mutaciones con respecto al sitio activo. Del sitio activo, solo los residuos Ser207 (amarillo) e His314 (naranjado) son ligeramente visibles. A) **Sm_LipA** (PDB 2qua). B) **Sm_LipA_M1**. Los aminoácidos hidrofóbicos se resaltan en verde, mientras que las mutaciones por Glu se muestran en rojo. El *lid* se señala con una flecha azul.

También se aprecia en la figura 17B que tres mutaciones recayeron muy cerca al sitio activo: I56E, L59E e I310E. En este contexto, no es de descartar que las mutaciones confieren cargas negativas demasiado cerca del sitio activo. Para apoyar esta hipótesis, se elaboraron gráficas de energía potencial de superficie para Sm_LipA y Sm_LipA_M1 (Figura 18).

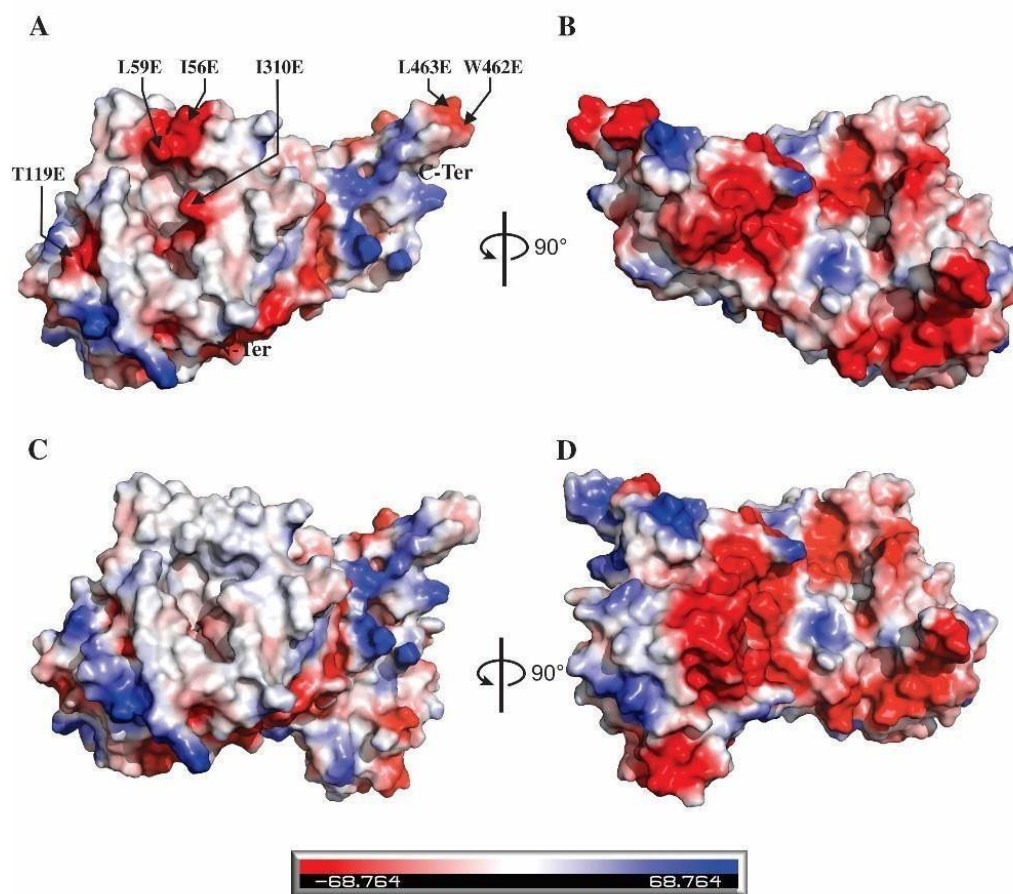


Figura 18. Gráficas de energía potencial de superficie. A) y B) **Sm_LipA_M1** en la orientación “recto” y “verso”, respectivamente. C) y D) **Sm_LipA**, ídem. La coloración roja representa cargas negativas y la azul cargas positivas. Imagen construida con la aplicación Pymol v. 2.3. (DeLano, 2002).

En una inspección visual de la Figura 18, es irrefutable que las cargas negativas alrededor del

sitio activo se acentuaron y deben repercutir en la interacción con el sustrato hidrofóbico. No está de más destacar la fuerte carga negativa de Sm_LipA en la parte posterior.

Finalmente, otro factor que pudo haber influido en la afinidad por el sustrato fue el plegamiento inadecuado y la inestabilidad de la enzima. En el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología desarrollaron un algoritmo para la determinación de los aminoácidos hidrofóbicos esenciales para el plegamiento y la estabilidad de una proteína. Aunque por ahora es información reservada, se pudo constatar mediante este método que las posiciones I56E, L59E, W462E y L463E son críticas y no deberían haberse cambiado. Aunque este dato queda meramente anecdótico sin evidencias científicas, por lo menos queda manifiesto que, aunque existan aminoácidos hidrofóbicos expuestos a la superficie, no quiere decir que no estén interviniendo de alguna manera en el plegamiento y la estabilidad. En este escenario, mutaciones aparentemente favorables que podrían tener efectos solubilizantes en la superficie, podrían también acarrear repercusiones graves en la correcta estructura y función de las proteínas.

6. CONCLUSIONES

Se logró sobreexpresar satisfactoriamente el gen mutante de la lipasa *LipA* (*Sm_LipA_M1*) en *E. coli* y las células transformadas e inducidas con IPTG mostraron un mayor crecimiento.

Se comprobó la expresión de Sm_LipA_M1 y se detectó su actividad hidrolasa tanto en el citoplasma y como en el periplasma.

Se concluyó un efecto desfavorable de las sustituciones por Glu en la actividad hidrolasa de los extractos crudos de LipA mutante, frente al *pNPB*.

Se encontraron las condiciones ideales para la actividad hidrolasa de la enzima en las fracciones del periplasma y el citoplasma insoluble, en un medio a 25 °C a pH 8 y pH 5, respectivamente.

Se desestimó la eficiencia hidrolítica de la enzima para la reacción de transesterificación por la deficiencia catalítica del mutante.

Referencias bibliográficas

- Abagyan, R., Totrov, M., & Kuznetsov, D. (1994). ICM a new method for protein modeling and design: applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation. *Journal of computational chemistry*, 15(5), 488-506.
- Abdou, A. M. (2003). Purification and partial characterization of psychrotrophic *Serratia marcescens* lipase. *Journal of Dairy Science*, 86(1), 127–132. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73591-7
- Aloulou, A., Rodriguez, J. A., Fernandez, S., van Oosterhout, D., Puccinelli, D., & Carrière, F. (2006). Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(9), 995-1013. doi:10.1016/j.bbalip.2006.06.009
- Andrade, T. A., Errico, M., & Christensen, K. V. (2017). Influence of the reaction conditions on the enzyme catalyzed transesterification of castor oil: A possible step in biodiesel production. *Bioresource Technology*, 243(1), 366–374. doi:10.1016/j.biortech.2017.06.118
- Angkawidjaja, C., & Kanaya, S. (2006). Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(23), 2804–2817. doi:10.1007/s00018-006-6172-x
- Angkawidjaja, C., Paul, A., Koga, Y., Takano, K., & Kanaya, S. (2005). Importance of a

repetitive nine-residue sequence motif for intracellular stability and functional structure of a family I.3 lipase. *FEBS Letters*, 579(21), 4707–4712. doi:10.1016/j.febslet.2005.07.041

Bajaj, A., Lohan, P., Jha, P. N., & Mehrotra, R. (2010). Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(1), 9–14. doi:10.1016/j.molcatb.2009.09.0

Balat, M. (2007). Production of biodiesel from vegetable oils: A survey. *Energy sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 29(10), 895–913. doi:10.1080/00908310500283359

Barraza, J., Hernández, J., Molina, D., & Serna, O. (2016). Expresión heteróloga de la lipasa lipa de *Serratia marcescens* (PDB: 2qua) en *Escherichia coli* BL21 (DE3): uso de extractos crudos para la transesterificación enzimática del aceite de palma africana con etanol (biodiésel) (tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Benjumea, P. N., Agudelo, J. R., & Cano, G. J. (2004). Estudio experimental de las variables que afectan la reacción de transesterificación del aceite crudo de palma para la producción de biodiesel. *Scientia et technica*, 1(24), 169-174. doi: 10.22517/23447214.7323

Berkmen, M. (2012). Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, 82(1), 240-251. doi:10.1016/j.pep.2011.10.009

Bornscheuer, U. T., & Pohl, M. (2001). Improved biocatalysts by directed evolution and

- rational protein design. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(2), 137–143.
doi:10.1016/S1367-5931(00)00182-4
- Burgess, C. (2018). *The reaction of biodiesel: transesterification*. Pennsylvania, USA: Alternative fuels from biomass sources. Recuperado de <https://www.e-education.psu.edu/egee439/node/684>
- Castellar Ortega, G. C., Angulo Mercado, E. R., & Cardozo Arrieta, B. M. (2014). Transesterification vegetable oils using heterogeneous catalysts. *Prospectiva*, 12(2), 90-104. doi:10.15665/rp.v12i2.293
- Chen, R. (2001). Enzyme engineering: rational redesign versus directed evolution. *Trends in Biotechnology*, 19(1), 13–14. doi:10.1016/S0167-7799(00)01522-5
- Chevallet, M., Luche, S., & Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, 1(4), 1852–1858. doi:10.1038/nprot.2006.288
- De Almeida, J. M., Moure, V. R., Müller-Santos, M., de Souza, E. M., Pedrosa, F. O., Mitchell, D. A., & Krieger, N. (2018). Tailoring recombinant lipases: keeping the His-tag favors esterification reactions, removing it favors hydrolysis reactions. *Scientific Reports*, 8(1), 10000. doi:10.1038/s41598-018-27579-8
- DeLano, W. L. (2002). The molecular graphics system. <http://www.pymol.org>.
- Delgado, J. E., Salgado, J. J., & Perez, R. (2015). Prospects of biofuels in Colombia. *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*, 14(27), 13–28.
- Fjerbaek, L., Christensen, K. V., & Norddahl, B. (2009). A review of the current state of

biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(5), 1298–1315. doi:10.1002/bit.22256

Fukuda, H., Kondo, A., & Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(5), 405–416. doi:10.1016/S1389-1723(01)80288-7

García-Silvera, E. E., Martínez-Morales, F., Bertrand, B., Morales-Guzmán, D., Rosas-Galván, N. S., León-Rodríguez, R., & Trejo-Hernández, M. R. (2018). Production and application of a thermostable lipase from *Serratia marcescens* in detergent formulation and biodiesel production. *Biotechnology and applied biochemistry*, 65(2), 156-172. Doi: 10.1002/bab.1565

Georgiou, G., Telford, J. N., Shuler, M. L., & Wilson, D. B. (1986). Localization of inclusion bodies in *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or alkaline phosphatase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52(5), 1157-1161.

Grossman, T. H., Kawasaki, E. S., Punreddy, S. R., et al., (1998). Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene*, 209(2), 95–103. doi:10.1016/s0378-1119(98)00020-1

Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6), 763–781. doi: 10.1007/s00253-004-1568-8

Hebditch, M., Carballo-Amador, M. A., Charonis, S., Curtis, R., & Warwicker, J. (2017).

- Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence. *Bioinformatics*, 33(19), 3098-3100.
- Hernández, K., García-Galán, C., & Fernández-Lafuente, R. (2011). Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads. *Enzyme and Microbial Technology*, 49(1), 72–78. doi:10.1016/j.enzmictec.2011.03.002
- Jaeger, K.E., & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 390–397. doi:10.1016/S0958-1669(02)00341-5
- Khan, F. I., Lan, D., Durrani, R., Huan, W., Zhao, Z., & Wang, Y. (2017). The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 5, 16. doi: 10.3389/fbioe.2017.00016
- Kutyshenko, V. P., Mikoulinskaia, G. V., Chernyshov, S. V., Yegorov, A. Y., Prokhorov, D. A., & Uversky, V. N. (2018). Effect of C-terminal His-tag and purification routine on the activity and structure of the metalloenzyme, l- alanyl-d-glutamate peptidase from the T5 bacteriophage. *International Journal of Biological Macromolecules*. 124(1), 810-818. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.219
- Larsen, M. W., Bornscheuer, U. T., & Hult, K. (2008). Expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* and various *Escherichia coli* systems. *Protein expression and purification*, 62(1), 90-97. doi:10.1016/j.pep.2008.07.012
- Li, S., Pang, H., Lin, K., Xu, J., Zhao, J., & Fan, L. (2011). Refolding, purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Serratia marcescens*

- ECU1010. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71(3), 171-176.
doi:10.1016/j.molcatb.2011.04.016
- Long, Z. D., Xu, J. H., Zhao, L. L., Pan, J., Yang, S., & Hua, L. (2007). Overexpression of *Serratia marcescens* lipase in *Escherichia coli* for efficient bioresolution of racemic ketoprofen. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 47(3), 105-110.
doi:10.1016/j.molcatb.2007.04.004
- Meier, R., Drepper, T., Svensson, V., Jaeger, K. E., & Baumann, U. (2007). A calcium-gated lid and a large β -roll sandwich are revealed by the crystal structure of extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(43), 31477–31483. doi:10.1074/jbc.M704942200
- Mishra, V. K., & Goswami, R. (2017). A review of production, properties and advantages of biodiesel. *Biofuels*, 1-17. doi:10.1080/17597269.2017.1336350
- Mohammadi, M., Sepehrizadeh, Z., Ebrahim-Habibi, A., Reza Shahverdi, A., Ali Faramarzi, M., & Setayesh, N. (2015). Bacterial expression and characterization of an active recombinant lipase A from *Serratia marcescens* with truncated C-terminal region. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 120(1), 84–92.
doi:10.1016/j.molcatb.2015.06.001
- Parawira, W. (2010). Biodiesel production from *Jatropha curcas*: A review. *Scientific Research and Essays*, 5(14), 1796–1808.
- Reetz, M. T., & Jaeger, K.-E. (2000). Enantioselective enzymes for organic synthesis created by directed evolution. *Chemistry – A European Journal*, 6(3), 407–412.
doi:10.1002/(SICI)1521-3765(20000204)6:3<407::AID-CHEM407>3.0.CO;2-Y

- Rueda, J., Hernandez. J., Barraza, J., & Serna, O. (2016). Expresión de la lipasa LipA de *Serratia marcescens* en *Escherichia coli* BL21 (DE3): Purificación y caracterización de la actividad aciltransferasa en reacciones de transesterificación entre aceite de palma (*Elaeis guineensis*) y etanol como aceptor acilo. (Tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- Samanta, U., Bahadur, R. P., & Chakrabarti, P. (2002). Quantifying the accessible surface area of protein residues in their local environment. *Protein Engineering, Design and Selection*, 15(8), 659–667. doi:10.1093/protein/15.8.659
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* third. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Smialowski, P., Dose, G., Torkler, P., Kaufmann, S., & Frishman, D. (2012). PROSO II - a new method for protein solubility prediction. *FEBS Journal*, 279(12), 2192–2200. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08603.x
- Sharma, K. R. (2015). Improvement of biodiesel product yield during simple consecutive-competitive reactions. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 5(04), 204–216. doi:10.4236/jeas.2015.54017
- Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19(8), 627–662. doi:10.1016/S0734-9750(01)00086-6
- Sockolosky, J. T., & Szoka, F. C. (2013). Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone. *Protein expression and purification*, 87(2), 129-135. doi: 10.1016/j.pep.2012.11.002

- Soltani, S., Rashid, U., Yunus, R., & Taufiq-Yap, Y. H. (2015). Synthesis of biodiesel through catalytic transesterification of various feedstocks using fast solvothermal technology: A Critical Review. *Catalysis Reviews*, 57(4), 407–435. doi:10.1080/01614940.2015.1066640
- Sormanni, P., Aprile, F. A., & Vendruscolo, M. (2015). The CamSol method of rational design of protein mutants with enhanced solubility. *Journal of molecular biology*, 427(2), 478–490. doi: 10.1016/j.jmb.2014.09.026
- Srivastava, A., & Prasad, R. (2000). Triglycerides-based diesel fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 4(2), 111–133. doi:10.1016/S1364-0321(99)00013-1
- Su, E., Xu, J., & Wu, X. (2015). High-level soluble expression of *Serratia marcescens* H30 lipase in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 62(1), 79–86. doi:10.1002/bab.1248
- Sweet, R. M., & Eisenberg, D. (1983). Correlation of sequence hydrophobicities measures similarity in three-dimensional protein structure. *Journal of molecular biology*, 171(4), 479–488. doi:10.1016/0022-2836(83)90041-4
- Tan, P., Hu, Z., Lou, D., & Li, Z. (2012). Exhaust emissions from a light-duty diesel engine with *Jatropha* biodiesel fuel. *Energy*, 39(1), 356–362. doi: 10.1016/j.energy.2012.01.002
- Tesfa, B., Mishra, R., Zhang, C., Gu, F., & Ball, A. D. (2013). Combustion and performance characteristics of CI (compression ignition) engine running with biodiesel. *Energy*, 51, 101–115. doi: 10.1016/j.energy.2013.01.010
- Treichel, H., Oliveira, D. de, Mazutti, M. A., Luccio, M. D., & Oliveira, J. V. (2010). A

- review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology*, 3(2), 182–196. doi:10.1007/s11947-009-0202-2
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461. doi:10.1002/jcc.21334
- Ujiie, A., Nakano, H., & Iwasaki, Y. (2016). Extracellular production of *Pseudozyma (Candida) antarctica* lipase B with genuine primary sequence in recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121(3), 303–309. doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.07.001
- Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., & Berendsen, H. J. C. (2005). GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1701–1718. doi:10.1002/jcc.20291
- Xu, Y., Wang, D., Mu, X. Q., Zhao, G. A., & Zhang, K. C. (2002). Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 in non-aqueous phase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 18(1), 29-37. doi:10.1016/S1381-1177(02)00056-5
- Zhang, W., Lu, J., Zhang, S., Liu, L., Pang, X., & Lv, J. (2018). Development an effective system to expression recombinant protein in *E. coli* via comparison and optimization of signal peptides: Expression of *Pseudomonas fluorescens* BJ-10 thermostable lipase as case study. *Microbial Cell Factories*, 17(1). doi:10.1186/s12934-018-0894-y
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC*

bioinformatics, 9(1), 40. doi:10.1186/1471-2105-9-40