

Producción heteróloga y determinación de la actividad hidrolasa de *p*-nitrofenil-palmitato (*p*-NPP), de la lipasa LipB de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116.

Alejandra Ramirez Camacho

Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de Biólogo

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2020

Agradecimientos

Este proyecto es el fruto final de los esfuerzos realizados durante mis años de formación. Es la recompensa a todos los días de traspasadas y madrugadas, los días de angustia, de estrés, pero también aquellos que me llenaban el alma y me demostraban que elegí el camino correcto. Durante todo este proceso, me acompañaron personas maravillosas. Es por esto, por lo que quiero agradecer:

A mis padres, María y Héctor, por siempre apoyarme en todo, por formarme y educarme como la persona que soy. Les agradezco por todo su amor, su compañía, su comprensión, por inculcarme tantos valores y ser un ejemplo para mí. A mi madre, por ser mi amiga, mi consejera y mi gran amor, por todos los sacrificios que realizó para permitirme culminar mi educación profesional.

A mi hermano, mis abuelos y demás familiares, que siempre estuvieron para mí con palabras de ánimo, por todo su cariño.

A mi novio Walther Estévez, por estar presente en todo momento, por su amor, sus consejos, su paciencia y por siempre brindarme un apoyo incondicional.

A la Universidad Industrial de Santander, por abrirme las puertas para iniciar con mis estudios, permitirme formarme como profesional.

A la escuela de Biología y todos sus profesores por brindarme sus conocimientos y aportar en mi proceso de formación como Bióloga.

A mi director Jorge Hernández, por brindarme su conocimiento para realizar este proyecto y su apoyo para culminarlo, por abrirme las puertas del CINBIN y por fomentar en mí la afinidad por la Biología Molecular.

A Oriana Serna, por estar presente en toda la realización de este proyecto, por su paciencia, sus consejos y su disposición para enseñarme.

A Jefferson Barraza, por sus consejos y compartir sus conocimientos.

A Tiana, por estar presente desde el primer día, por ser mi compañera y amiga en todo el proceso, por todos los días de estudio y los gratos momentos que pasamos juntas.

A todas las personas que aportaron un granito de arena para ser la persona que soy. ¡Muchas Gracias!

Índice general

Introducción	8
1. Objetivos	11
1.1. Objetivo general:	11
1.2. Objetivos específicos:	11
2. Marco teórico	12
2.1. Enzimas lipasas	12
2.2. Aplicaciones industriales de las lipasas	13
2.3. Lipasas en actinobacterias	14
2.4. Lipasa de <i>Amycolatopsis</i> sp.	14
3. Metodología	15
3.1. Diseño y construcción del vector de expresión recombinante con el gen <i>LipB</i> de <i>Amycolatopsis</i> sp.	15
3.2. Transformación de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).	16
3.3. Expresión heteróloga de <i>LipB</i>.	16
3.4. Determinación de la actividad hidrolítica de Amyco_LipB.	18
3.5. Determinación de las concentraciones de proteína.	19
3.6. Métodos corrientes de biología molecular.	19
4. Resultados	19
4.1. Diseño y construcción del vector de expresión recombinante con <i>LipB</i>.	19
4.2. Control de la construcción y transformación de <i>E. coli</i>.	21
4.3. Sobreexpresión de Amyco_LipB.	22
4.4. Detección de actividad hidrolítica frente a <i>p</i>-NPP	26
5. Discusión	30
6. Conclusiones	34
7. Recomendaciones	35
Referencias bibliográficas	36

Índice de figuras

Figura 1. Reacción de hidrólisis de <i>p</i> -NPP. Fórmula para calcular la actividad específica de la proteína Amyco_LipB de <i>Amycolatopsis</i> sp.....	19
Figura 2. Traducción del gen <i>LipB</i> de <i>Amycolatopsis</i> sp..	21
Figura 3. Mapa del plásmido pET_Amyco_LipB.....	22
Figura 4. Verificación de la clonación del gen <i>LipB</i> en el vector pET-22b.....	23
Figura 5. Curva de crecimiento bacteriano de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).	25
Figura 6. Expresión y localización subcelular de la proteína Amyco_LipB	26
Figura 7. Sobreexpresión de la proteína Amyco_LipB.....	27
Figura 8. Actividad hidrolítica específica de fracciones insolubles frente al <i>p</i> -NPP	29
Figura 9. Efecto de la concentración de urea en la solubilización de Amyco_LipB.....	30
Figura 10. Efecto de la concentración de CaCl ₂ en el replegamiento de Amyco_LipB.....	30

Resumen

Título: Producción heteróloga y determinación de la actividad hidrolasa de *p*-Nitrofenil-Palmitato (*p*-NPP), de la lipasa LipB de *Amycolatopsis* sp ATCC 39116.

Autor: Alejandra Ramirez Camacho*

Palabras clave: Lipasa, *Amycolatopsis* sp, Actividad enzimática, Hidrolisis, Solubilidad.

Descripción: Las lipasas microbianas son muy apetecidas en la industria por su gran potencial biotecnológico. Su uso se ve limitado por los costos de producción e importación, por lo cual, se está a la búsqueda de una producción local de lipasas, especialmente en modelos de expresión bacterianos. Anteriormente, en el CINBIN se adelantó la caracterización bioinformática de una secuencia de lipasa potencial de *Amycolatopsis* sp., con características estructurales y funcionales similares a CalB de *Candida antarctica*, un referente en la industria. No obstante, no se sabe nada sobre su actividad enzimática *in vitro*. En este trabajo de grado, se expresó el gen *LipB* de *Amycolatopsis* sp. en *Escherichia coli* y se demostró la capacidad de la enzima Amyco_LipB para hidrolizar ésteres de cadena larga. Inicialmente, se diseñó un gen *LipB* compatible con el sistema de expresión de *E. coli*, basados en la secuencia proteica alojada en Genbank. Posteriormente, el gen *LipB* sintético se expresó en *E. coli* con el vector pET-22b. Se encontró que la enzima recombinante Amyco_LipB se expresa en cantidad suficiente para pruebas de actividad con extractos crudos, pero es insoluble y debe ser reconstituida para su correcto funcionamiento. Para comprobar la actividad hidrolítica de la proteína, se realizaron ensayos de actividad enzimática con extractos crudos, utilizando *p*-Nitrofenil-Palmitato como sustrato. Los resultados mostraron una actividad específica de ~13,5 U/mg, valor similar al obtenido por Barraza (2016) para la lipasa LipA de *Serratia marcescens*. No obstante, unos pasos adicionales de solubilización (0,8 M urea) y plegamiento (16 mM CaCl₂) incrementaron la actividad enzimática a 40 U/mg de proteína total. Comparada con la actividad específica de CalB, Amyco_LipB presenta unos niveles de actividad promisorios. Los resultados demuestran que Amyco_LipB hidroliza ésteres de cadena larga y su actividad enzimática la convierten en una enzima potencial para ser evaluada en reacciones de transesterificación.

* Escuela de Biología, Universidad Industrial de Santander. Director: Jorge Hernández Torres, Ph.D. Co-directores: Oriana Danuta Serna Daza, Bióloga; Jefferson Yadir Barraza Gómez, Químico.

Abstract

Title: Heterologous production and determination of the hydrolase activity of *p*-Nitrophenyl-Palmitate (*p*-NPP), of the lipase LipB of *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116.

Author: Alejandra Ramírez Camacho*

Keywords: Lipase, *Amycolatopsis* sp, Enzymatic Activity, Hydrolysis, Solubility.

Description: Microbial lipases are highly appreciated in the industry because of their vast biotechnological potential. Their use is limited by production and import costs, in the case of Colombia. Currently, there is a search for the local production of lipases, especially in bacterial expression models. Previously, in the CINBIN, the bioinformatic characterization of a potential lipase sequence of *Amycolatopsis* sp. was performed, revealing structural and functional characteristics similar to that of CalB of *Candida antarctica*, a reference in the industry. However, nothing is known about its *in vitro* enzymatic activity. In this work, the *LipB* gene of *Amycolatopsis* sp. was expressed in *Escherichia coli*, and the ability of Amyco_LipB to hydrolyze long-chain esters was demonstrated. Initially, a version of the *LipB* gene compatible with the *E. coli* expression system was designed, based on the protein sequence registered in Genbank. Later, a synthetic *LipB* gene was expressed in *E. coli* with the pET-22b vector. It was found that the recombinant enzyme Amyco_LipB was sufficiently expressed for activity tests with crude extracts, but it is mostly insoluble and must be reconstituted for proper functioning. To test the hydrolytic activity of Amyco_LipB, enzyme activity tests were performed with crude extracts, using *p*-Nitrophenyl palmitate as a substrate. Results showed a specific activity of ~13.5 U/mg, similar to the value obtained by Barraza (2016) for the *Serratia marcescens* lipase. However, additional solubilization (0.8 M urea) and folding steps (16 mM CaCl₂) increased the enzymatic activity to 40 U/mg of total protein, i.e., 300%. Compared to the specific activity of CalB, Amyco_LipB shows promising lipase activity levels. The results show that Amyco_LipB can hydrolyze long-chain esters, and the enzymatic activity values pledges for its potential use in transesterification reactions.

* Escuela de Biología, Universidad Industrial de Santander. Director: Jorge Hernández Torres, Ph.D. Co-directores: Oriana Danuta Serna Daza, Bióloga; Jefferson Yadir Barraza Gómez, Químico

Introducción

Las lipasas o carboxilesterasas (EC 3.1.1.3) son un grupo de enzimas ubicuas que participan en el metabolismo y transporte de los lípidos en organismos vivos (Jaeger, 2002). Debido a su importancia en el metabolismo y transporte de las grasas, se encuentran en todos los grupos taxonómicos. Inicialmente, se obtenían de plantas y tejidos animales, pero las cantidades recuperadas eran muy bajas y esto limitaba su uso en la industria (Grunwald, 2009).

Estas enzimas poseen una gran versatilidad, actuando sobre un gran número de sustratos y catalizando diferentes reacciones (hidrólisis, esterificaciones y transesterificaciones) dependiendo del medio en el que actúen (Santamaría, 2015). Actualmente, la principal fuente de obtención son los microorganismos, principalmente de hongos y bacterias, estas últimas, más fáciles de manipular, cultivar y procesar (Olempska et al., 2006).

Las lipasas poseen numerosas aplicaciones industriales, entre las cuales se destacan la fabricación de detergentes, cosméticos, el tratamiento de aguas residuales, la remoción de ácidos grasos, etc. Además, el interés por estas enzimas ha aumentado, debido a que han ido ganando relevancia en la producción enzimática de biocombustibles como fuente de energía renovable (Aceves y Castañeda, 2012).

Si bien es cierto que existe una gran cantidad de enzimas comerciales provenientes de microorganismos como *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp o *Candida* sp, también es cierto que su uso por la industria nacional del biodiésel está limitado por los altos costos de importación (Alarcón, 2008; Andrade et al., 2017). Por ello, la búsqueda y producción de lipasas locales podría significar una solución a la demanda al por mayor. Los sistemas de expresión heterólogos (levaduras y bacterias) son una estrategia accesible para la producción de estas enzimas de interés

(Puigdomènech, 2010). Entre otros, la sobreexpresión en *Escherichia coli* tiene varias ventajas: Un control más estricto de la expresión; alto nivel de expresión de proteínas comunes, tanto como otras más difíciles de sobreexpresar; la regulación estricta permite la alta expresión de proteínas tóxicas; a criterio del investigador, la expresión se puede regular desde niveles muy bajos hasta muy altos (Bilgimol et al., 2015).

CalB de *Candida antarctica* es un referente en la producción industrial de biodiésel, por sus niveles de eficiencia mayores al 90%. Además, posee una amplia especificidad de sustrato, alta actividad y enantioselectividad, por lo que se considera una enzima importante en biotecnología (Housaindokht *et al.*, (2012). El grupo de investigación CINBIN han estado caracterizando nuevas lipasas bacterianas para la producción de biodiésel, con muy buenos resultados (Barraza, 2016). Lipasas bacterianas con alta identidad de secuencia y estructura, respecto a CalB, podrían igualar e incluso superar la eficiencia de esta última en reacciones de transesterificación. Inicialmente, esta hipótesis fue sometida a escrutinio desde el punto de vista bioinformático. Las búsquedas mediante BlastP en Genbank revelaron que una lipasa de *Amycolatopsis* sp presenta una identidad de 36% y una cobertura de 93% con respecto a CalB. Los análisis de *docking* y dinámica molecular sugieren que esta enzima podría presentar una actividad competitiva en la hidrólisis de triglicéridos (Mejía, 2018).

Muy poco se ha publicado sobre la actividad enzimática *in vitro* de esta lipasa. Como un primer paso, en este trabajo de grado se exploró el potencial de Amyco_LipB para catalizar reacciones de hidrólisis de ésteres de cadena larga. Para ello, se sobreexpresó el gen *LipB* de *Amycolatopsis* sp. en *E. coli*. Posteriormente, se comprobó la actividad hidrolasa de extractos crudos de la proteína recombinante en ensayos con *p*- Nitrofenil-palmitato (*p*-NPP) como sustrato.

Los resultados sugieren que Amyco_LipB es capaz de catalizar reacciones hidrolíticas con ésteres de cadena larga, lo que servirá de base para emprender ensayos de hidrólisis de triglicéridos precursores del biodiésel (aceite de palma africana). En el futuro se podría explorar el potencial de esta enzima en reacciones de transesterificación.

1. Objetivos

1.1. Objetivo general:

Demostrar la actividad hidrolasa de *p*-Nitrofenil-palmitato (*p*-NPP), de extractos crudos de Amyco_LipB de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116, sobreexpresada en *E. coli*.

1.2. Objetivos específicos:

Sobreexpresar el gen *lipB* de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 en *E. coli* BL21 (DE3).

Determinar la actividad hidrolasa de extractos crudos de la proteína recombinante en ensayos con *p*-Nitrofenil palmitato (*p*-NPP) como sustrato.

Contrastar la actividad específica con la de lipasas de referencia.

2. Marco teórico

2.1. Enzimas lipasas

Las lipasas (E.C. 3.1.1.3) forman un grupo muy diverso y heterogéneo de enzimas que catalizan la hidrólisis y síntesis de ésteres carboxílicos (Ferrerías, 2011). Poseen una gran versatilidad, siendo capaces de operar sobre un gran número de sustratos y catalizar diferentes reacciones, como hidrólisis, esterificación y transesterificación (Santamaría, 2015).

Las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. En un principio fueron obtenidas a partir de plantas y tejidos de animales. Sin embargo, las cantidades obtenibles representaban un limitante para ser utilizadas en la industria (Grunwald, 2009). En la actualidad se extraen principalmente de microorganismos como bacterias, levaduras y hongos, ya que su naturaleza molecular y actividad enzimática, así como la expresión y posibilidades de manipulación, evidencian un gran potencial biotecnológico (Gupta *et al.*, 2004; Olempska *et al.*, 2006).

Las enzimas lipolíticas de origen microbiano son, en general, inducibles. A nivel biotecnológico, Bacteria representa gran interés, dado que, al ser organismos más simples, son más fáciles de cultivar y permiten su expresión heteróloga (Lotti *et al.*, 1998; Olempska *et al.*, 2006). Además, las enzimas bacterianas son activas en un amplio rango de sustratos y altamente estables a diferentes temperaturas, pH y solventes orgánicos. Bacteria es un grupo muy amplio; aunque existe una gran diversidad de enzimas lipolíticas pertenecientes a bacterias terrestres, las lipasas conocidas de actinomicetos no son muy abundantes y, sin embargo, tienen un uso promisorio a nivel industrial (Navarro y Periago, 2012; Kumar *et al.*, 2017).

2.2. Aplicaciones industriales de las lipasas

El enorme potencial biotecnológico exhibido por las lipasas radica en una serie de ventajas que presentan frente a los catalizadores no biológicos convencionales. Es por esto, que cada día aumentan los procesos desarrollados en la industria en los cuales intervienen estas enzimas (Aceves y Castañeda, 2012).

Uno de los grupos más importantes en biocatálisis y en otras aplicaciones en el sector industrial son las lipasas microbianas. Estas enzimas catalizan una amplia variedad de reacciones como la hidrólisis parcial o total de triacilglicéridos y reacciones de esterificación, transesterificación e interesterificación de los lípidos en medios no acuosos. Además, la mayoría de los microorganismos que las producen las secretan al medio, facilitando y reduciendo los costos de producción (Colla *et al.*, 2010; Bora, 2013).

En la industria alimentaria, son de interés por sus diversas aplicaciones como aditivos alimenticios, en la modificación del sabor y en la síntesis de ésteres con importante actividad antioxidante. Se utilizan en la hidrólisis de grasas para la fabricación de detergentes y el tratamiento de aguas residuales. Específicamente, en la degradación y remoción de sustratos grasos. Además, debido a su capacidad para llevar a cabo reacciones de transesterificación, las lipasas han adquirido un papel muy importante en la producción de biocombustibles, como resultado de la creciente demanda mundial en el uso de energía renovable (Aceves y Castañeda, 2012).

A nivel comercial, las enzimas más utilizadas provienen principalmente de *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp, *Aspergillus* sp, *Mucor* sp, *Yarrowia* sp, *Rhizopus* sp y *Candida* sp (Alarcón, 2008; Ertuğrul, 2007). Estos microorganismos tienen la capacidad de producir lipasas extracelulares, que

facilitan su recuperación del medio de cultivo. Pese a las características que poseen las lipasas y a lo que representa su aplicación a nivel industrial, su uso se ve afectado por la pérdida progresiva de la actividad catalítica *in vitro*. Igualmente, los altos costos de importación (hasta \$ 10000 USD/Kg para CalB de *Candida antártica*, ~9 U/mg) limitan el abastecimiento en grandes volúmenes (Meher *et al.*, 2006; Andrade *et al.*, 2017).

2.3. Lipasas en actinobacterias

Las actinobacterias son microorganismos ubicuos ampliamente distribuidos en los ecosistemas naturales (Minotto *et al.*, 2014). El filo comprende bacterias con lipasas comercialmente interesantes debido a los diversos procesos celulares en los que participan (Côté y Shareck, 2008; Salwan, 2018). Sin embargo, en este filo, la mayoría de los estudios se han enfocado en la actividad lipolítica exógena del género *Streptomyces*. Este grupo ha mostrado evidencias de una alta producción y cumple con los requisitos industriales para la comercialización (Salwan, 2018; Kumar *et al.*, 2017).

2.4. Lipasa de *Amycolatopsis* sp.

Un estudio bioinformático previo en nuestros laboratorios (Mejía, 2018) encontró en Genbank la secuencia de una lipasa de *Amycolatopsis* sp. con características estructurales y funcionales similares a LipB de *Candida antarctica* (CalB), una enzima importante en biotecnología y un referente funcional en la industria de los biocombustibles (Housaindokht *et al.*, 2012). La lipasa de *Amycolatopsis* sp presenta una identidad de 36% y una cobertura de 93% con

respecto a CalB. Los análisis de *docking* y dinámica molecular predijeron que esta enzima podría asemejarse a CalB en la hidrólisis de triglicéridos (Mejía, 2018).

La lipasa de *Amycolatopsis* sp (en este trabajo denominada Amyco_LipB) está compuesta de 321 aminoácidos. Los análisis *in silico* revelan que conserva la estricta tríada catalítica de Serina, Ácido aspártico e Histidina, además del pentapéptido “GX SXG” y el dipéptido HG encontrados comúnmente en las lipasas (Mejía, 2018). Los datos recopilados sugieren que Amyco_LipB pertenece a una Lipasa EstA/Esterasa EstB, miembro de la superfamilia del plegamiento α/β hidrolasa (Mejía, 2018). De demostrarse la actividad hidrolítica de triglicéridos de Amyco_LipB, se podría explorar su competitividad ante CALB en reacciones de transesterificación.

3. Metodología

3.1. Diseño y construcción del vector de expresión recombinante con el gen *LipB* de *Amycolatopsis* sp.

Se diseñó un gen sintético basado en la secuencia WP_020417691.1, anotada como lipasa en Genbank y proveniente de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116. El gen *LipB*, modificado hacia el uso de codones de *E. coli*, se clonó en los sitios de restricción *Nco* I y *Bam* HI del vector de expresión pET-22b (Novagen®). Dando lugar, al plásmido recombinante pET_Amyco_LipB. La síntesis del gen fue contratada con la empresa General Biosystems Inc. y la correcta construcción del vector se verificó mediante análisis de restricción y secuenciación (Macrogen Inc.).

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

Se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) con los plásmidos pET_Amyco_LipB y el plásmido no recombinante pET-22b como control, mediante choque térmico en presencia de 0.1 M CaCl₂ (Sambrook *et al.*, 1989). Las células transformadas se sembraron sobre medio LB (Luria-Bertani) con 100 µg/ml ampicilina y algunas colonias transformadas se sembraron en medio líquido LB-ampicilina para realizar minipreparaciones de plásmido. Se seleccionaron cepas únicas que fueron criopreservadas según el protocolo de Novagen (Novagen pET System manual, 11ª edición) y almacenadas en el cepario del Laboratorio de Biología Molecular (LBM) de la Escuela de Biología UIS.

3.3. Expresión heteróloga de *LipB*.

Para inocular los precultivos, las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas fueron sembradas en cajas de Petri de medio LB, suplementado con 100 µg/mL ampicilina y cultivadas a 37 °C durante la noche. Colonias individuales fueron transferidas a 100 mL de medio líquido LB-ampicilina e incubado la noche a 30 °C y 180 rpm. El crecimiento bacteriano fue monitoreado a hasta alcanzar una densidad óptica (OD_{600nm}) de 0,8 – 1,2 y se indujo la expresión con 0.1 mM IPTG. Luego de 0, 1 y 3 h de inducción, se recuperaron las siguientes fracciones celulares: fracción total (FT), medio (FM), periplasma (FP), citoplasma soluble (FS) y citoplasma insoluble (FI), siguiendo el protocolo “VI. Purifying Target Proteins” formulado por Novagen (Novagen pET System manual, 11ª edición). Alícuotas de las fracciones fueron precipitadas con TCA, con el fin de obtener una mayor concentración de la proteína y eliminar residuos de medio de cultivo (Oliveira *et al.*, 1999).

Posteriormente, se realizó la separación de los extractos crudos de proteína en geles 12% SDS-PAGE según el método de Laemmli (1970) y se revelaron con nitrato de plata (Merril *et al.*, 1979). Finalmente, se realizaron ensayos de actividad con el fin de detectar la fracción celular y el tiempo en el que más se produce Amyco_LipB. Dado que la proteína en cuestión se encontró en forma insoluble, se realizaron unos pasos adicionales para su solubilización y reconstitución, estandarizados por Barraza (2016) para LipA de *Serratia marcescens*: La fracción insoluble fue extraída mediante sonicación indirecta, método que implica una ruptura previa de la pared celular con una solución de 20% p/v de sacarosa y un rompimiento de la membrana citoplasmática mediante un baño ultrasónico (37 kHz) durante 15 min, en hielo. Luego, las muestras fueron centrifugadas (14000 x g/10 min) y los sedimentos se resuspendieron en 20 mM Tris-HCl pH 7.5. La solubilización de la proteína se llevó a cabo con urea. Alícuotas de 50 µL de Amyco_LipB se centrifugaron (14000 x g/5 min) y el sedimento se resuspendió en diferentes concentraciones de urea (0.4, 0.8, 1.6, 3.2 y 6.4 M) adicionando 8 mM CaCl₂ y 50 mM Tris-HCl pH 8.0. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 min para la activación de Amyco_LipB. Se realizaron pruebas de actividad hidrolítica, utilizando *p*-NPP como sustrato. Para lograr el correcto plegamiento de la proteína se utilizó CaCl₂. Alícuotas de 50 µL de Amyco_LipB se centrifugaron (14000 x g/5 min) y los sedimentos se resuspendieron en diferentes concentraciones de CaCl₂ (4, 8, 12 y 16 mM), adicionando 0.8 M urea y 50 mM Tris-HCl pH 8.0. Se realizaron pruebas de actividad para de determinar la concentración más favorable de este cofactor.

3.4. Determinación de la actividad hidrolítica de Amyco_LipB.

La actividad hidrolítica de Amyco_LipB frente al *p*-Nitrofenil palmitato (*p*-NPP) se cuantificó mediante espectrofotometría, midiendo el incremento de absorbancia del *p*-Nitrofenol ($pK_a = 7,15$ a $25\text{ }^\circ\text{C}$, $\epsilon_{348} = 6890\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) a 348 nm . La mezcla de la reacción contenía $10\text{ }\mu\text{L}$ de extractos crudos de Amyco_LipB, $950\text{ }\mu\text{L}$ de 50 mM Tris-HCl ($\text{pH } 8.0$) y 0.4 mM *p*-NPP. Las reacciones se realizaron a temperatura ambiente ($\sim 25\text{ }^\circ\text{C}$) durante 3 min (Fernández, 2017).

Una unidad internacional de actividad hidrolítica (U) es definida como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar $1\text{ }\mu\text{mol}$ de *p*-NPP/min bajo las condiciones establecidas. La reacción de hidrólisis del *p*-NPP y la fórmula mediante la cual se calculó la actividad específica de Amyco_LipB se especifican en la Figura 1.

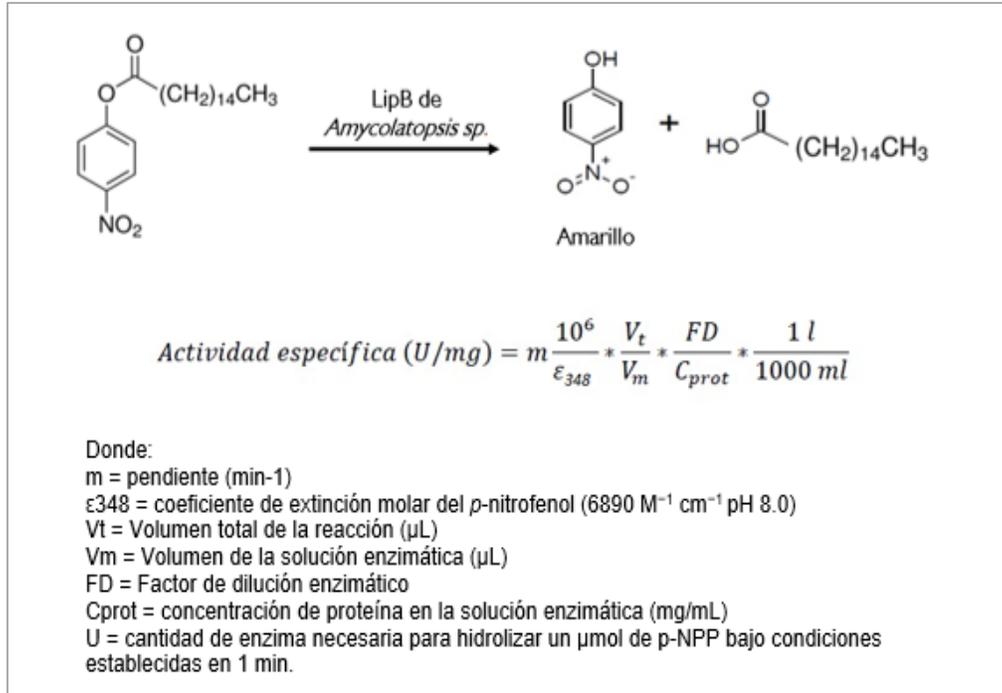


Figura 1. Arriba: reacción de hidrólisis de *p*-NPP. Abajo: fórmula para calcular la actividad específica de la proteína Amyco_LipB.

3.5. Determinación de las concentraciones de proteína.

Las concentraciones de proteína se calcularon mediante el método colorimétrico de Bradford con un máximo de absorción de 595 nm (Bradford, 1976). La curva patrón se construyó con Albúmina de Suero Bovino (BSA) disuelta en 30 mM Tris-HCl pH 7.5, utilizando un rango de concentraciones de 0.0 – 1.0 mg/mL. Las absorbancias se midieron 3 min después de la adición de 1 mL del reactivo de Bradford a 100 μ L de muestra, incubadas a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

3.6. Métodos corrientes de biología molecular.

La electroforesis en gel de agarosa, la extracción de plásmido en pequeña cantidad y demás técnicas moleculares usuales se realizaron con base en el manual de Sambrook et al, 1989.

4. Resultados

4.1. Diseño y construcción del vector de expresión recombinante con *LipB*.

Como dicho anteriormente, el diseño del gen se realizó tomando como referencia la secuencia de Genbank WP_020417691.1, anotada como perteneciente a una lipasa α/β hidrolasa de *Amycolatopsis sp.* ATCC 39116. La secuencia del gen sintético (Figura 2) se construyó desde cero, ya que la secuencia WP_020417691.1 es de aminoácidos y no existe a la fecha una secuencia nucleotídica disponible. En el diseño se implementó el uso de codones optimizado de *E. coli*. Se

añadieron los sitios de restricción *Nco* I en 5' y *Bam* HI en 3', para un empalme en fase con el péptido señal peIB, el cual, en principio, dirige la proteína al periplasma. Al marco de lectura abierto se adicionó una etiqueta C-Terminal de polihistidina [6xHis-tag], para futura purificación en columna de afinidad.

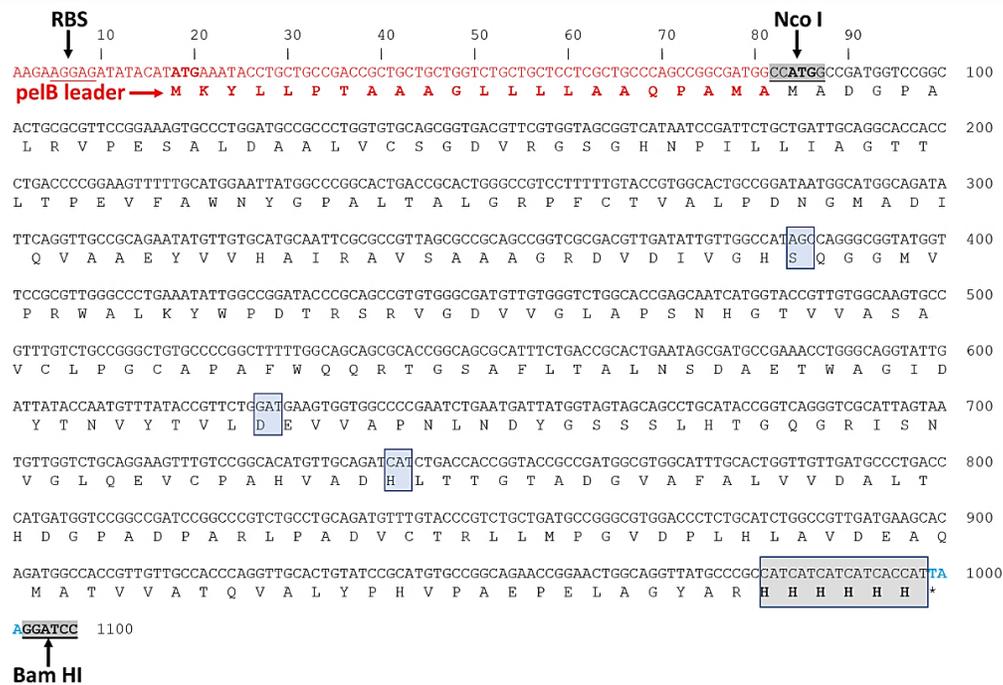


Figura 2. Traducción del gen sintético *LipB* de *Amycolatopsis sp.* Los nucleótidos y aminoácidos en rojo pertenecen al vector pET-22b. Los residuos de la triada catalítica Ser-Asp-His se rodean en recuadros celestes.

El gen *LipB* consta de 918 pb y codifica para una proteína de 305 aminoácidos con peso molecular estimado de 31867 kDa. No obstante, el péptido señal peIB le adiciona los residuos MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMA, aumentando el número total de aminoácidos a 327 y un peso molecular de la proteína precursora estimado en 34078 Da. Como dicho anteriormente, la secuencia señal peIB N-terminal le confiere un potencial en la exportación de la proteína hacia el

periplasma bacteriano y mejora la estabilidad de las enzimas recombinantes especialmente de las lipasas (Medina, 2006). Como resultado final, se obtuvo el plásmido recombinante pET_Amyco_LipB, cuya estructura se representa en la Figura 3.

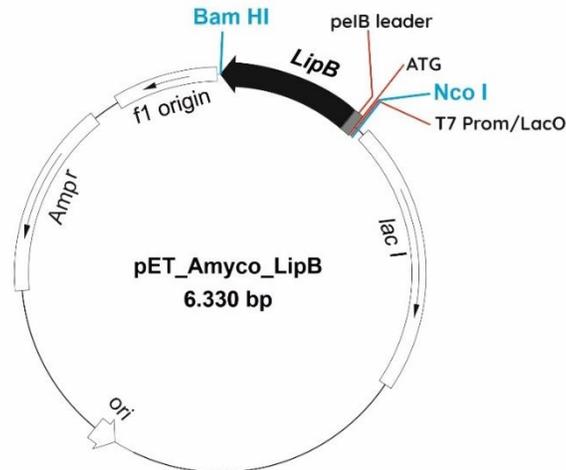


Figura 3. Mapa del plásmido recombinante pET_Amyco_LipB. La flecha negra representa el gen *lipB* de *Amycolatopsis* sp. Otros componentes del vector pET22b: Gen de resistencia a la ampicilina (*Amp^r*), el gen de origen de replicación (*ori*), el gen regulador *lacI* y *f1 origin*, el origen de replicación del bacteriófago *f1*.

4.2. Control de la construcción y transformación de *E. coli*.

Células de *E. coli* BL21 (DE3) fueron transformadas con los plásmidos recombinante (pET_Amyco_LipB) y no recombinante (pET-22b). Se hicieron minipreparaciones de plásmido y se procedió a la digestión con las enzimas de restricción *Nco I* y *Bam HI* como control de la correcta inserción del gen. Los productos fueron visualizados en un gel de 1% agarosa, en el que se corroboró la presencia de dos bandas, una a la altura de 5.5 kb (vector) y una segunda a ~1 kb

(Figura 4). Los tamaños estimados para el vector y el inserto coinciden con lo visualizado en el gel, por lo que se concluyó que la clonación y la transformación de las células de *E. coli* BL21 se realizaron correctamente. Sin embargo, la construcción completa fue paralelamente verificada mediante secuenciación. Finalmente, se seleccionaron colonias únicas recombinantes, sembradas en medio de cultivo LB suplementado con ampicilina. Estos clones fueron criopreservados y registrados en el cepario del LMB de la Escuela de biología de la UIS.

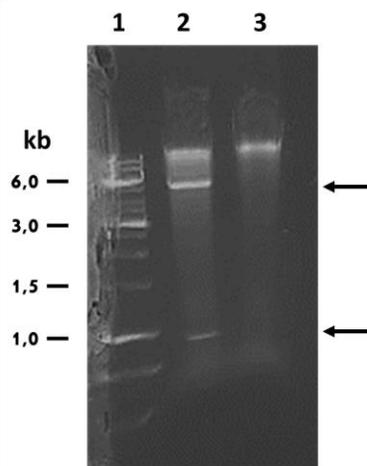


Figura 4. Verificación de la clonación del gen *LipB* en el vector pET-22b. Fotografía del gel 1% agarosa. Las flechas a la derecha señalan las bandas de vector (5,4 kb) y del inserto (918 pb). Carril 1: GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific™). Carril 2: plásmido pET_Amyco_LipB digerido con *Nco* I y *Bam* HI. Carril 3: plásmido pET_Amyco_LipB no digerido (control).

4.3. Sobreexpresión de Amyco_LipB.

Para iniciar la expresión de la proteína Amyco_LipB, se monitoreó el crecimiento del precultivo hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.8-1.2, momento en el que se adicionó 0.1 mM IPTG. Los valores de OD_{600nm} luego de 0, 1 y 3 h de inducción evidenciaron un crecimiento lineal en las células del

hospedero durante las 3 h en las que se llevó a cabo la expresión (Figura 5). Por trabajos previos en el laboratorio, se ha observado un crecimiento más rápido cuando las cepas de *E. coli* están expresando genes de lipasas. Inicialmente, las células transformadas con los plásmidos pET_Amyco_LipB y pET-22b (control no recombinante) iniciaron la inducción con valores de OD_{600nm} cercanos (1.20 y 1.14, respectivamente), después de un precultivo de alrededor de 15 h. Sin embargo, desde que se adicionó el IPTG, se hizo evidente que el cultivo de transformado con *LipB* presentaba un mayor incremento en el crecimiento bacteriano, superando cerca del triple el ΔA obtenido por las células transformadas con el plásmido no recombinante ($\Delta A=0,58/0,22$, respectivamente). Por ensayo y error se consideró suficiente un tiempo máximo de inducción de 3 h. Posteriormente, se procedió a la lisis de las células de *E. coli* y centrifugación diferencial en las siguientes fracciones: fracción total (FT), medio (FM), periplasma (FP), citoplasma soluble (FS) y citoplasma insoluble (FI).

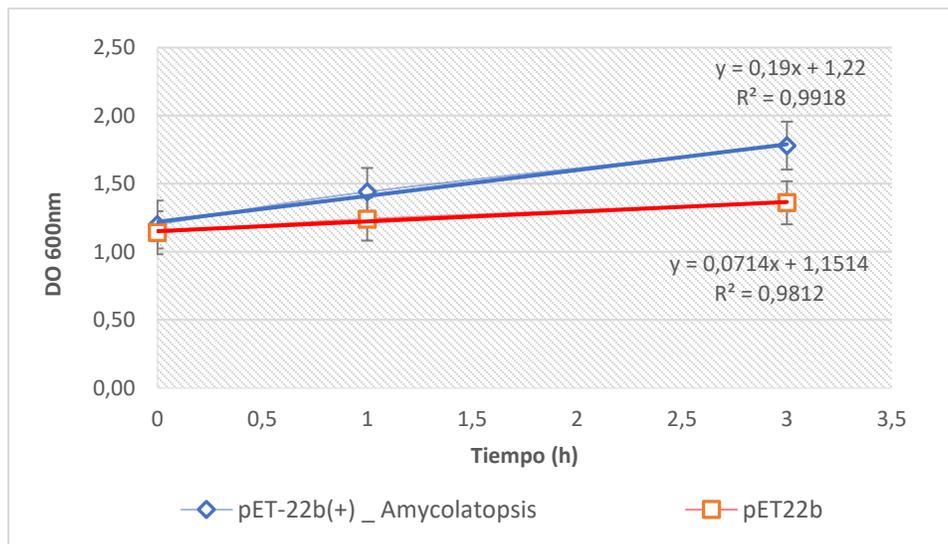


Figura 5. Curva de crecimiento bacteriano de *E. coli* BL21 (DE3). Células transformadas con los plásmidos pET_Amyco_LipB (azul) y pET-22b (rojo) como control no recombinante. Factor de dilución: 10X. Las viñetas representan el promedio de tres mediciones independientes.

Posteriormente, las fracciones se separaron por electroforesis SDS-PAGE, para evidenciar la o las fracciones celulares en las que se presentaba la proteína Amyco_LipB y el tiempo de inducción suficiente. En este estudio, se esperaba poder visualizar una banda a la altura de ~32 kDa sin péptido señal peIB y de ~34 kDa con péptido señal. En la Figura 6 se observan los resultados y se lograron sacar dos conclusiones importantes. En primer lugar, al comparar los patrones de bandas de los extractos de *E. coli* recombinante (pET_Amyco_LipB) con respecto al control (solo pET-22b), se observa una banda de gran intensidad cercana a 35 kDa ausente en el control (carriles 2 y 7). Resulta razonable deducir que esa banda corresponde, en efecto, a la proteína Amyco_LipB. En segundo lugar, la enzima se encuentra presente tanto en el extracto total, como, en particular, en la fracción insoluble. Es decir, la proteína Amyco_LipB no se exporta al periplasma como estaba previsto, sino que, por causa de su insolubilidad, se aglomera en el citoplasma.

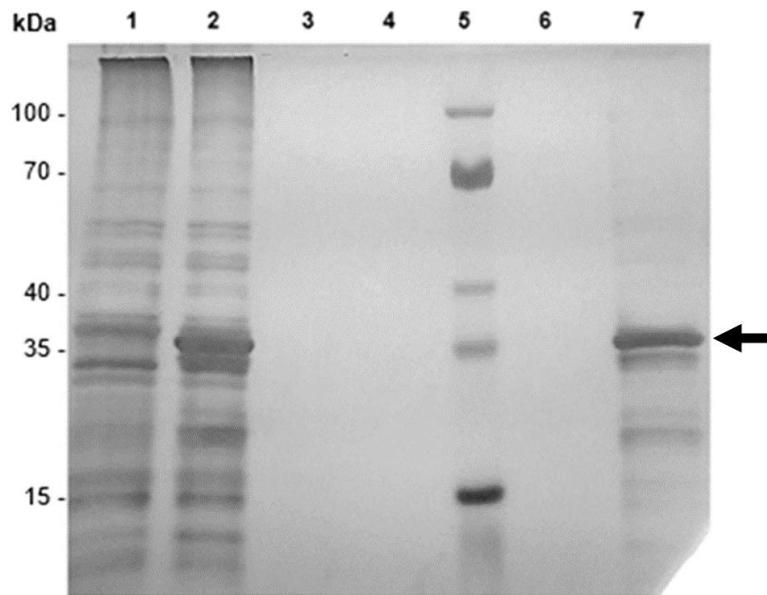


Figura 6. Expresión y localización subcelular de la proteína Amyco_LipB. Gel SDS-PAGE de extractos crudos de *E. coli* BL21 recombinante, después de 3 h de inducción. **Carril 1:** extracto total, pET-22b. **Carril 2:** extracto total, pET_Amyco_LipB. **Carril 3:** fracción de medio,

pET_Amyco_LipB. **Carril 4:** fracción de periplasma pET_Amyco_LipB. **Carril 5:** Marcador de peso molecular. **Carril 6:** fracción citoplasma soluble, pET_Amyco_LipB. **Carril 7:** fracción insoluble pET_Amyco_LipB. La flecha señala una proteína candidata Amyco_LipB a una altura de la banda del marcador de ~35 kDa.

Para corroborar la identidad de la lipasa Amyco_LipB, lo ideal habría sido realizar un *Western blot* (Mahmood y Yang, 2012). Lamentablemente, no contábamos con los anticuerpos anti-Amyco_LipB para realizar la prueba. Sin embargo, un monitoreo de la dinámica de la expresión podría evidenciar la inducibilidad del péptido de 34 kDa. De esta manera, se hicieron nuevas pruebas de expresión y se hicieron extractos de fracción citoplasmática insoluble, luego de 0, 1 y 3 h de inducción.

Los extractos de la fracción citoplasmática insoluble se separaron por SDS-PAGE y los resultados se muestran en la Figura 7. Por razones metodológicas, los carriles 1 (pET-22b) y 2 (pET_Amyco_LipB), pertenecientes a extractos totales de 3 h de cultivo después de inducción, no tienen la resolución de la Figura 6. No obstante, conviene aclarar que son los mismos extractos de los carriles 1 y 2 de esa figura.

En lo referente a la dinámica de expresión post-inducción, sí se observa de manera cualitativa el incremento progresivo de la proteína de ~35 kDa y su ausencia, una vez más, en el control negativo (pET-22b). Interesantemente, el carril 3 (fracción insoluble pET_Amyco_LipB, 0 h de inducción) refleja una cierta cantidad de proteína en ausencia del inductor. Este fenómeno se ha observado en el laboratorio con muchas otras proteínas recombinantes y se atribuye a una expresión basal.

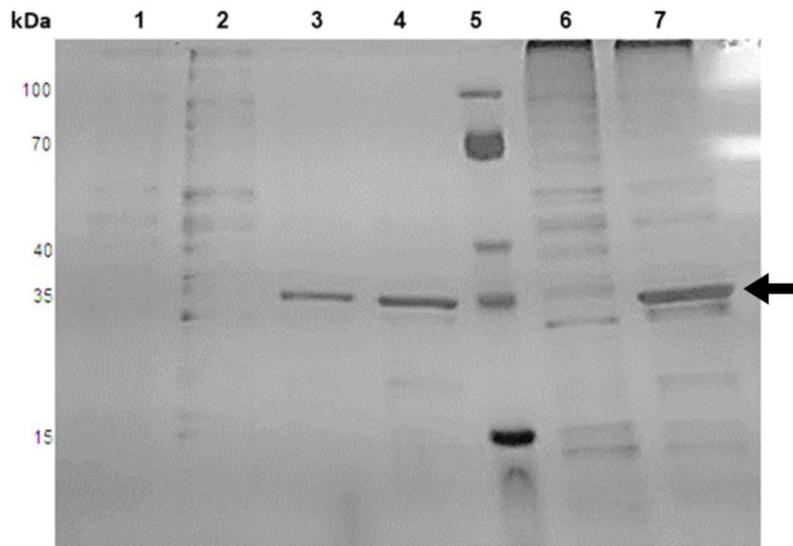


Figura 7. Sobreexpresión de la proteína Amyco_LipB. Gel SDS-PAGE de las fracciones total e insoluble de los cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) recombinantes. **Carril 1:** extracto total, pET-22b, 3 h. **Carril 2:** extracto total, pET_Amyco_LipB, 3 h. **Carril 3:** fracción insoluble pET_Amyco_LipB, 0 h. **Carril 4:** fracción insoluble pET_Amyco_LipB, 1 h. **Carril 7:** fracción insoluble pET_Amyco_LipB, 3 h. **Carril 5:** Marcador de peso molecular. **Carril 6:** fracción insoluble (FI), pET-22b (control negativo). La flecha señala la proteína candidata Amyco_LipB.

4.4. Detección de actividad hidrolítica frente a *p*-NPP

Una prueba contundente de la expresión de la enzima Amyco_LipB es la aparición de una actividad hidrolítica de ésteres de cadena larga, ausente en *E. coli* BL21. Para evidenciar esta actividad, se realizaron ensayos de actividad enzimática con extractos crudos, utilizando como

sustrato *p*-Nitrofenil palmitato (*p*-NPP). Inicialmente, se probaron todas las fracciones, pero al final se terminó trabajando con las fracciones citoplasmáticas insolubles con 3 h de inducción.

La actividad hidrolítica se cuantificó midiendo el incremento de absorbancia del *p*-Nitrofenol a 348 nm. Normalmente, las lipasas alojadas en las fracciones insolubles no están correctamente plegadas y forman agregados hidrofóbicos; es decir, se requiere de una reconstitución de la proteína. Por esta razón, se implementó el protocolo propuesto por Barraza (2016) para la lipasa LipA de *Serratia marcescens* y las concentraciones de solubilizante y cofactor que dieron mejor resultado para esa enzima. Se ensayó con 0.8 M urea y 16 mM CaCl₂ y se logró evidenciar la actividad hidrolasa. Se calcularon las actividades específicas de las fracciones insolubles de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con pET-22b y pET_Amyco_LipB, después de 3 h de inducción (Figura 8).

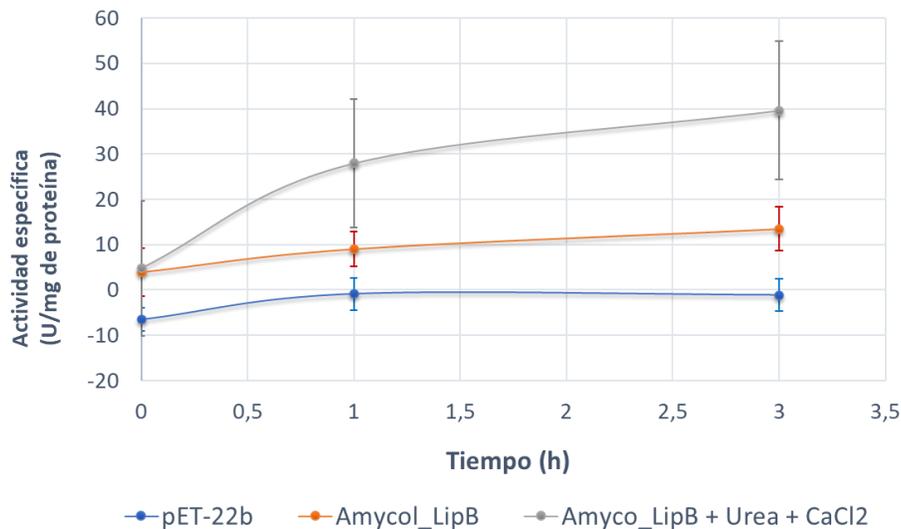


Figura 8. Actividad hidrolítica específica de fracciones insolubles frente al *p*-NPP. Curva en azul: pET-22b (control negativo). Curva en anaranjado: pET_Amyco_LipB. Curva en gris: pET_Amyco_LipB + 0.8 M urea + 16 mM CaCl₂ [i.e., enzima reconstituida].

En la Figura 8, se puede observar que los cultivos transformados con el plásmido no recombinante pET-22b no presentan ningún tipo de actividad hidrolasa. Es sabido que *E. coli* por sí misma carece de actividad hidrolítica frente al *p*-NPP (Antonczak et al., 2009). Por otra parte, la actividad sí se observa en las reacciones con la fracción insoluble de pET_Amyco_LipB, con una actividad específica de aproximadamente 13,5 U/mg. Este valor resultó ser el mismo que el de la lipasa LipA de *S. marcescens* (Barraza, 2016). Finalmente, el efecto de la reconstitución de la enzima se constató con los pasos adicionales de solubilización y plegamiento. En efecto, los valores de actividad específica de Amyco_LipB se elevaron un 300%, con valores de hasta 40 U/mg de proteína total.

Cuatro conclusiones importantes derivan de los resultados precedentes. Primero la construcción del plásmido pET_Amyco_LipB fue la correcta. Segundo, que la enzima Amyco_LipB sí es una lipasa y es capaz de hidrolizar ésteres de cadena larga. Tercero, la enzima recombinante es insoluble y debe ser reconstituida para su correcto funcionamiento. Y cuarto, como otras lipasas, la enzima podría requerir la presencia de CaCl_2 en el medio de reacción.

Como la reconstitución tuvo un efecto positivo, se realizó un ensayo adicional con diferentes concentraciones tanto del agente solubilizante como del cofactor. Los resultados se muestran en las figuras 9 y 10.

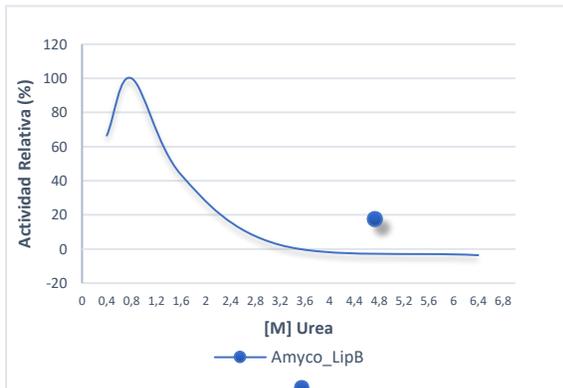


Figura 9. Efecto de la concentración de urea en la solubilización de Amyco_LipB. Extractos FI (8 mM CaCl₂) del cultivo pET_Amyco_LipB a 3 h de inducción. El 100% de actividad relativa corresponde a la máxima actividad de cada preparación.

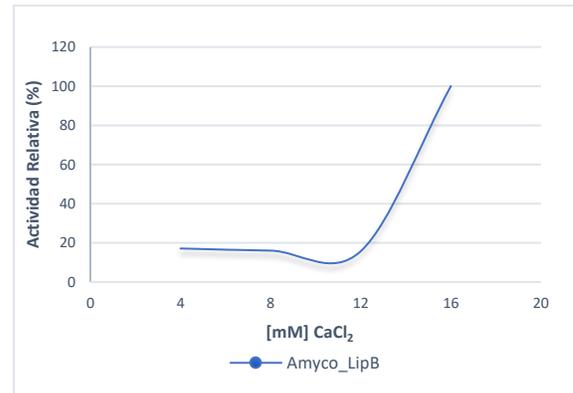


Figura 10. Efecto de la concentración de CaCl₂ en el replegamiento de Amyco_LipB. Extractos FI (0,8 M urea) del cultivo pET_Amyco_LipB a 3 h de inducción. El 100% de actividad relativa corresponde a la máxima actividad de cada preparación.

Como se puede observar en la Figura 9, la concentración apropiada de urea para obtener la mejor actividad con los extractos crudos de la fracción insoluble es de 0,8 M. Sin duda, la enzima requiere de reconstitución para su actividad. Este aspecto deberá tenerse en cuenta para trabajos futuros. Por otra parte, la enzima mostró una dependencia de CaCl₂, al igual que la lipasa LipA de *S. marcescens* (Barraza, 2016). Valores inferiores a 16 mM resultan inhibidores. A manera de conclusión general, los resultados permiten afirmar que la enzima Amyco_LipB sí es una lipasa capaz de hidrolizar ésteres de cadena larga y es dependiente de cofactores iónicos para su correcto funcionamiento.

5. Discusión

En este trabajo de grado se logró sobreexpresar y demostrar la actividad hidrolasa de la lipasa Amyco_LipB de *Amycolatopsis sp.* ATCC 39116, utilizando como sustrato *p*-Nitrofenil-palmitato (p-NPP). En la actualidad, las posibilidades de éxito de un trabajo como el aquí realizado se incrementan con un robusto análisis bioinformático previo, como se hizo en este caso. Los resultados aquí obtenidos servirán de base para emprender otros de mayor envergadura, como la evaluación de Amyco_LipB en reacciones de transesterificación.

Las lipasas microbianas exhiben un gran potencial biotecnológico y un sinnúmero de secuencias están alojadas en Genbank, a la espera de ser puestas a prueba en usos específicos. Además, las posibilidades son, por ahora, infinitas, porque Colombia es un país afortunado en cuanto a su diversidad de ecosistemas, la biodiversidad misma y la variedad potencial de enzimas asociadas.

Para incursionar de manera competitiva en la producción no solo de materia prima sino de un valor agregado como es el biodiésel, se necesita tener a disposición enzimas eficientes y específicas. Por ahora, su uso se ve limitado por los altos costos de importación. Ya que paulatinamente las tecnologías de ADN recombinante se han hecho cada vez más accesibles a los países en vías de desarrollo, es tiempo de aprovecharlas y explotarlas en nuestro beneficio. El uso de sistemas de expresión heterólogos, especialmente en modelos bacterianos, es una alternativa viable para aumentar exponencialmente la producción de proteínas requeridas en la industria (Aceves y Castañeda, 2012; Andrade et al., 2017).

La lipasa Amycol_LipB de *Amycolatopsis sp.* ATCC 39116, ostenta características estructurales y funcionales similares a la lipasa B de referencia CalB de *Candida antarctica*. Hasta el presente, poco se conocía sobre su actividad *in vitro*, aunque las predicciones bioinformáticas sugerían un potencial importante (Mejía, 2018). A pesar de dichas predicciones, no es raro que surjan imprevistos y obstáculos que se deben resolver directamente en el laboratorio.

La idea de fusionar el péptido señal *pelB* a Amycol_LipB fue con la intención de exportarla al periplasma y con ello facilitar la solubilización y purificación de la enzima (Zhang et al., 2018). Sin embargo, Amyco_LipB se concentró en la fracción insoluble y en forma inactiva, en forma de un probable precursor peIB-Amyco_LipB. Para la exportación al periplasma, es necesaria la adición de un péptido señal, pero esta solución puede no ser suficiente (Novagen pET System manual, 11ª edición). Las lipasas han demostrado ser especialmente insolubles y la exportación al periplasma ha sido exitosa en algunos casos, pero no todos (Akatsuka et al., 1994; Li et al., 1995; Mohammadi et al., 2015). Afortunadamente, la reconstitución con urea fue suficiente para demostrar la actividad hidrolasa, objetivo principal de este trabajo.

Está documentado que las proteínas recombinantes y el sistema pET ejercen un efecto ya sea positivo o negativo en el metabolismo del hospedero (Saraswat et al., 1999) y específicamente las lipasas (Rahmen, et al., 2016). Para este estudio en específico, se observó una influencia positiva en la tasa de crecimiento de los cultivos de *E. coli* BL21, hecho que se le atribuye a la presencia de la proteína Amyco_LipB en este cultivo. Resultados similares se han obtenido en el laboratorio con otras lipasas, entre ellas LipA de *Serratia marcescens* (Barraza, 2016).

Con base en los resultados se puede concluir que Amyco_LipB se expresó en *E. coli* y demostró su funcionalidad. Por una parte, el peso molecular de 35 kDa, presente en las fracciones insoluble y total, coincide muy de cerca con el estimado para Amyco_LipB, más precisamente el precursor peIB-Amyco_LipB. Además, *E. coli* carece de hidrolasas de ésteres de cadena larga y esta actividad debe atribuirse a la proteína recombinante de 35 kDa (Nantel y Proulx, 1973; Antonczak et al., 2009).

Desafortunadamente, Amyco_LipB resultó insoluble, aunque era de esperarse por ser una propiedad común en las lipasas. En el estado actual de insolubilidad, los valores de actividad específica alcanzaron 13 U/mg de proteína. Sin embargo, la reconstitución con urea y la adición de CaCl₂ aumentaron visiblemente la solubilidad y el plegamiento de la proteína. No podemos afirmar que estas condiciones fisicoquímicas sean las óptimas, pero sí que, además de incrementar notablemente la actividad (40 U/mg), detectamos una dependencia no prevista de CaCl₂, en el medio de reacción.

El tercer objetivo específico de este trabajo proponía contrastar la actividad específica de Amyco_LipB con la de lipasas de referencia. Es importante aclarar que nuestros experimentos se hicieron con extractos crudos de *E. coli*, así que la comparación puede considerarse apenas preliminar. Contrastando los valores de actividad específica hidrolasa frente al *p*-NPP con los de Vorderwulbecke et al (1992), Amyco_LipB se podría calificar de promisorio. *Candida lipolítica* y otras especies del género están entre 25 y 50 U/mg. *Bacillus* sp., *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. presentan cero actividad. En contraste, *Pseudomonas fluorescens* sp y *Chromobacter viscosum* ostentan actividades de 54500 y 11700 U/mg. Es de reiterar que la comparación de actividades

entre extractos crudos y proteínas puras resulta dudosa. Sin embargo, dado que Amyco_LipB en su estado crudo al menos iguala a *Candida* sp, la cual es empleada en la producción de biodiésel, se justifica purificar la enzima y determinar la actividad específica en condiciones óptimas. Finalmente, se podrá explorar el comportamiento de Amyco_LipB en reacciones de transesterificación y determinar su potencial en la producción de biodiésel, objetivo final del macroproyecto del laboratorio.

6. Conclusiones

Se logró sobreexpresar exitosamente la lipasa Amycol_LipB de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 en *E. coli* BL21, utilizando el vector de expresión pET-22b. La proteína se restringió a la fracción insoluble y el mejor tiempo para recuperarla fue luego de 3 h de inducción con IPTG.

En este trabajo, se demostró la actividad hidrolasa de los extractos crudos de Amyco_LipB recombinante, utilizando como sustrato *p*-NPP. En su estado insoluble, la actividad específica alcanzó valores de 13,5 U/mg. Sin embargo, la adición de 0.8 M urea y 16 mM de CaCl₂, favorecen notablemente la actividad de la proteína (40 U/mg).

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que Amyco_LipB es una enzima que justifica el estudio de su potencial en reacciones de transesterificación.

7. Recomendaciones

Teniendo en cuenta el efecto positivo que ejerce el CaCl_2 sobre Amyco_LipB y la ausencia de conocimiento sobre las características y de la lipasa, se recomienda evaluar el efecto de otras concentraciones de CaCl_2 y la adición de diferentes iones en el rendimiento de la proteína.

Además, con el fin de caracterizar Amyco_LipB y encontrar sus condiciones óptimas de trabajo, se recomienda evaluar los efectos de las variaciones de temperatura y pH sobre su actividad enzimática con la enzima purificada.

Se recomienda realizar ensayos de actividad enzimática utilizando como sustrato otros ésteres de *p*-NP de longitud de cadena variable.

Para concluir, se recomienda realizar la purificación de la proteína Amyco_LipB a través del método de cromatografía por columna de afinidad, aprovechando la cola de histidinas [6xHis-tag] que posee la construcción para este fin y recalcular la actividad específica con la proteína pura.

Referencias bibliográficas

- Aceves, A., & Castañeda, L. (2012). Producción biotecnológica de lipasas microbianas, una alternativa sostenible para la utilización de residuos agroindustriales. *Vitae*, 19(3), 244-247.
- Akatsuka, H., Kawai, E., Omori, K., Komatsubara, S., Shibatani, T., & Tosa, T. (1994). The *lipA* gene of *Serratia marcescens* which encodes an extracellular lipase having no N-terminal signal peptide. *Journal of bacteriology*, 176: 1949-1956.
- Alarcón, M. (2008). Producción de la lipasa Lip2 de *Candida rugosa* en el sistema *Pichia pastoris*: Caracterización y aplicación en sistemas de síntesis (Tesis de doctorado en biotecnología). *Universidad autónoma de Barcelona*, España.
- 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 biodiésel production. *Bioresource Technology*, 243, 366–374.
- Antonczak, A. K., Simova, Z., & Tippmann, E. M. (2009). A critical examination of *Escherichia coli* esterase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 284(42), 28795-28800.
- Arakawa, T., & Timasheff, S. N. (1984). Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding. *Biochemistry*, 23(35), 5912-5923.

- 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.
- Bilgimol C Joseph, B.V., Pichaimuthu, S., Srimeenakshi, S., Murthy, M., Selvakumar, K., Ganesan M, & Manjunath, S.R. (2015). An overview of the parameters for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Cell Science & Therapy*, 6:5
- Bora, L., Gohain, D., & Das, R. (2013). Recent advances in production and biotechnological applications of thermostable and alkaline bacterial lipases. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(11), 1959-1970.
- Bradford, M. (1976). A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2) 248-254.
- Colla, LM., Rizzardi, J., Pinto, MH., Reinehr, CO., Bertolin, TE., & Vieira, JA. (2010). Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresour Technol*, 101(21), 8308 – 8314.
- Côté, A., & Shareck, F. (2008). Cloning, purification, and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Enzyme and Microbial Technology*, 42(5), 381–388.

- Ertuğrul, S., Dönmez, G., & Takaç, S. (2007). Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*, *149*(3), 720-724.
- Fernández Gómez, P. (2017). Producción heteróloga y caracterización bioquímica de una acetilxilano esterasa de *Lactobacillus plantarum* WCFS1. (Tesis de maestría). *Universidad Complutense de Madrid*, España.
- Grunwald, P. (2009). Structure, function and application of enzymes, in *Biocatalysis, Biochemical Fundamentals and applications*. *Imperial college press*, 293–336.
- 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.
- Housaindokht, M. R., Bozorgmehr, M. R., & Monhemi, H. (2012). Structural behavior of *Candida antarctica* lipase B in water and supercritical carbon dioxide: A molecular dynamic simulation study. *Journal of Supercritical Fluids*, *63*, 180–186.
- Jaeger, K. E., & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, *13*(4), 390-397.
- Kumar, A., Sharma, A., Kaur, G., Makkar, P., & Kaur, J. (2017). Functional characterization of hypothetical proteins of *Mycobacterium tuberculosis* with possible esterase/lipase signature: a cumulative in silico and in vitro approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *35*(6), 1226–1243.

- Laemmli, UK. (1970). Escisión de proteínas estructurales durante el ensamblaje de la cabeza del bacteriófago T4. *Naturaleza*, 227, 680-685.
- Lotti, M., Monticelli, S., Montesinos, J. L., Brocca, S., Valero, F. & Lafuente, J. (1998). Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. *Chemistry and Physics of Lipids*, 93(1-2), 143–148.
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4(9), 429–434.
- Medina, E., De León, A. & Barba de la Rosa, A. (2006). Estudio de la expresión de proteínas de interés biotecnológico en el citoplasma y periplasma de *Escherichia coli* recombinante: Utilidad de fuentes de carbono alternas (tesis de doctorado). *Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.*, México.
- Meher, I., Vidyasagar, D., & Naik, S. (2006). Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10(3), 248–268.
- Mejía, J.L. (2018). Lipasas en actinomicetos: caracterización bioinformática de una lipasa con la mayor identidad de secuencia con Lip B de *Candida antártica*. (Tesis de pregrado). *Universidad Industrial de Santander*, Colombia.
- Merrill, CR, Switzer, RC & Van Keuren, ML (1979). Rastrear polipéptidos en extractos celulares y fluidos corporales humanos detectados por electroforesis bidimensional y una tinción de plata altamente sensible. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias*, 76(9), 4335-4339.

- Minotto, E., Milagre, L. P., Oliveira, M. T., & Van Der Sand, S. T. (2014). Enzyme characterization of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants. *Journal of Advanced Scientific Research*, 5(2), 16-23.
- Nantel, G., & Proulx, P. (1973). Lipase activity in *E. coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 316(2), 156-161.
- Navarro González, I., & Periago, M. J. (2012). Bacterial lipolytic enzymes: properties, classification, structure, technology applications and framework law. *In Anales de Veterinaria de Murcia*, 28, 45-65.
- Olempska, Z. S., Merker, R. I., Ditto, M. D., & DiNovi, M. J. (2006). Food processing enzymes from recombinant microorganisms, a review. *Regulatory toxicology and Pharmacology*, 45(2), 144-158.
- Oliveira, R., Marques, F., & Azeredo, J. (1999). Purification of polysaccharides from a biofilm matrix by selective precipitation of proteins. *Biotechnology techniques*, 13(6), 391-393.
- Ferreras, P. E. R. (2011). Expresión y estudio de enzimas termoestables de interés biotecnológico (Tesis Doctoral). *Universidad Autónoma de Madrid*, España.
- Puigdomènech, P. (2010). Las técnicas del ADN recombinante, la genómica y los organismos modificados genéticamente (OMG). *España*, 95.
- Rahmen, N. Büchs, J. & Jaeger, K. E. (2016). Characterization of recombinant protein production in *Escherichia coli* and its influence on host cell metabolic activity (No. RWTH-2016-01972). *Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik*. Tesis doctoral.

- Salwan, R., & Sharma, V. (2018). The role of Actinobacteria in the production of industrial enzymes. *Elsevier*, 165-177
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual with the laboratory manual source book. *Prensa de laboratorio Cold Spring Harbor*.
- Santamaría, D. P. (2015). Estudio y caracterización de lipasas comerciales con potencial biotecnológico para la modificación de aceites (Tesis Doctoral). *Universidad de Burgos*, España.
- Saraswat V, Kim DY, Lee J, & Park Y-H. (1999). Effect of specific production rate of recombinant protein on multimerization of plasmid vector and gene expression level. *FEMS Microbiol Lett.* 179(2). 367-373.
- Vorderwulbecke, T.; Kieslich, K. & Erdmann, H. (1992). Comparison of lipases by different assays. *Enzyme and Microbial Technology*, 14(8), 631-639.