

Tesina de grado
Licenciatura en Bioquímica

Purificación y caracterización de lipasas
de *Geobacillus thermocatenulatus* y de
Pseudomonas fluorescens para su
aplicación en reacciones de aminólisis

María Eugenia Cedrés

Tutora: Dra. Gabriela Irazoqui

Cotutor: B.C. Agustín Castilla

Área Bioquímica, Departamento de Biociencias,
Facultad de Química, Universidad de la República.

Montevideo, Uruguay

2021

Contenido

Resumen.....	3
Agradecimientos	5
Introducción	6
1. Importancia de la biocatálisis.....	6
2. Generalidades de lipasas y esterasas.....	6
2.1 Estructura y mecanismo de acción de las lipasas.....	7
2.2 Propiedades bioquímicas de las lipasas	9
2.3 Aplicaciones industriales de las lipasas.....	10
3. Importancia de los compuestos ópticamente puros en la industria farmacéutica	10
4. Síntesis de L-deuterodeprenil	11
Objetivos	13
1. Objetivo general.....	13
2. Objetivos específicos.....	13
Materiales y métodos	14
1. Materiales microbiológicos	14
1.1 Cepas de <i>Escherichia coli</i>	14
1.2 Medios de cultivo y soluciones	14
2. Métodos	17
2.1 Producción de estearasa I de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (PFE I).....	17
2.2 Purificación de estearasa I de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (PFE I).....	17
2.3 Producción lipasa 2 de <i>Geobacillus thermocatenulatus</i> (BTL2)	17
2.4 Purificación de lipasa 2 de <i>Geobacillus thermocatenulatus</i> (BTL-2)	18
2.5 Ensayo de actividad de lipasa 2 de <i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	18
2.5.1 Ensayo de actividad de lipasa CAL-B	19
2.6 Determinación del coeficiente de extinción molar (ϵ) de p-NP a 340 nm en función del pH.....	19
2.7 Determinación de pH óptimo.....	19
2.8 Determinación de temperatura óptima	19
2.9 Efectos de la concentración de Tritón X-100 en la actividad enzimática.....	19
2.10 Efecto de los metales sobre la actividad enzimática.....	20
2.11 Estudio de estabilidad con la temperatura	20
2.12 Estudio de estabilidad con el pH	20
2.13 Determinación de parámetros cinéticos	20
2.14 Estudio de estabilidad en solventes orgánicos	20
2.15 Síntesis enzimática de acetato de 1-metil-3-fenilpropilamina.....	21

2.15.1	Síntesis enzimática de acetato de α -metilbencilamina.....	21
2.16	Hidrólisis de acetato de 1-metil-3-fenilpropilamina	21
2.16.1	Hidrólisis de acetato de α -metilbencilamina	21
	Resultados y discusión	22
	Producción y purificación de estearasa I de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (PFE I)	22
	Producción y purificación de lipasa BTL-2 de <i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	23
	Determinación del coeficiente de extinción molar (ϵ) de p-NitroFenol (pNP) a 348 nm en función del pH	25
	Determinación del pH óptimo de BTL-2.....	28
	Determinación de temperatura óptima de BTL-2.....	29
	Efectos de la concentración de Tritón X-100 en la actividad enzimática.....	30
	Efectos de la presencia de metales en la actividad enzimática	32
	Estabilidad con la temperatura	33
	Estabilidad con el pH.....	34
	Determinación de parámetros cinéticos.....	36
	Estabilidad en presencia de solventes orgánicos.....	37
	Optimización de las condiciones de cromatografía en capa fina para seguimiento de reacción de aminólisis.....	38
	Síntesis de amidas (aminólisis) empleando enzima modelo.....	39
	Hidrólisis de amidas empleando enzima modelo	41
	Síntesis de amidas (aminólisis) empleando BTL-2	43
	Hidrólisis de amidas empleando lipasa BTL-2	46
	Conclusiones	49
	Perspectivas	49
	Referencias.....	51
	Anexo	55
	Apéndice.....	56

Resumen

Las lipasas (EC 3.1.1.3) y esterases (EC 3.1.1.1) son enzimas que hidrolizan los carboxil-ésteres en acilglicéridos, pertenecientes a la familia de las α/β -hidrolasas. La elevada estabilidad de algunas lipasas en condiciones extremas de pH, temperatura, o en presencia de solventes orgánicos, además de su gran versatilidad catalítica ubica a las lipasas como una herramienta muy valiosa en la biocatálisis, lo que ha permitido su aplicación en un amplio espectro de procesos industriales.

La eficacia de muchos fármacos depende en parte de su quiralidad debido a que los enantiómeros pueden presentar diferentes respuestas farmacológicas y biológicas: una forma enantiomérica puede ser activa mientras que la otra puede ser inactiva e incluso tóxica. La resolución de una mezcla racémica puede realizarse por métodos químicos o enzimáticos, siendo esta última opción la preferida

El compuesto L-deuterodeprenil es un radiotrazador utilizado en la evaluación in vivo de patologías neurológicas que implican sobreexpresión de la enzima monoaminoxidasa B en casos de astrocitosis, como en la enfermedad de Alzheimer. El L-deuterodeprenil puede ser obtenido mediante dos pasos químicos a partir de L-anfetamina. El desafío es obtener esta molécula precursora de manera ópticamente pura. Partiendo de la mezcla racémica de la anfetamina y usando lipasas es posible obtener la L-anfetamina. Pensando en esta aplicación se realizó la purificación de la lipasa recombinante de *Geobacillus thermocatenulatus* BTL-2, su caracterización bioquímica y se aplicó en reacciones de aminólisis e hidrólisis de amidas empleando aminas y amidas modelo como sustrato.

La purificación de la lipasa BTL-2 se realizó mediante una cromatografía de interacción hidrofóbica seguida de una cromatografía de intercambio aniónico. Posteriormente, se determinó que la temperatura óptima de la enzima estudiada es de 70 °C, permitiendo clasificarla como hipertermofílica. Se determinó además que la enzima presenta un pH óptimo entre 7,5 y 9,5, lo que caracteriza a BTL-2 como una lipasa alcalina. Se vio que esta lipasa es activada en presencia de Tritón X-100 al 0,02 % v/v, y en presencia de metales iónicos tales como el Ni⁺² 1 mM y el Cu⁺² 10 mM. La lipasa de *Geobacillus thermocatenulatus* demostró ser estable a temperaturas menores o iguales a 50 °C y a pH entre 5 y 10, luego de 1 hora de incubación. Además, la enzima estudiada es activa en presencia de acetato de etilo y es estable en polietilenglicol luego de 24 hs de incubación, dos características que posibilitan y favorecen su uso en múltiples reacciones donde participen solventes orgánicos.

Finalmente, se llevaron a cabo reacciones de aminólisis e hidrólisis de amidas modelos usando la lipasa de *Cándida antártica* (CAL-B) cuyo uso como biocatalizador en este tipo de reacciones está ampliamente reportado. Para el seguimiento del avance de la reacción se utilizó cromatografía en capa fina para lo cual fue necesario optimizar las condiciones del sistema. Por último, se aplicó la lipasa BTL-2 a estas reacciones, observándose la hidrólisis de las amidas de interés. Todos estos resultados nos permitirían considerar a la lipasa de *Geobacillus thermocatenulatus* como una posible herramienta para la síntesis del precursor del L-deuterodeprenil.

Agradecimientos

Primero que nada, me gustaría agradecerles a Gabriela y Agustín por aceptar ser mis tutores y guiarme en esta tesina de grado. Este tiempo compartido me dio las bases y herramientas que necesitaré de aquí en más. Agradecerle a Gabriela por estar siempre que la necesité, brindándome todo su apoyo no solo en lo que respecta a la tesina, por estar siempre dispuesta a ayudarme, y por comprenderme y darme para adelante siempre. Agradezco especialmente a Agustín por ser un gran compañero además de mi co-tutor, por compartirme todos sus secretos de laboratorio y ser tan generoso y buena persona, además de un excelente profesional.

Gracias a la Dra. Carolina Villadóniga por aceptar ser mi evaluadora externa en este trabajo.

Agradecer también a Sonia, quien me brindó su ayuda siempre que la necesité a lo largo de este trabajo.

A todos quienes trabajan en el laboratorio de bioquímica, por recibirme con los brazos abiertos desde el primer día, gracias por estar siempre que los necesité, y por tener siempre una sonrisa para dar.

A Ceci Giacomini por confiar en mí, darme el último empujón de motivación que necesitaba, por darme la oportunidad de aplicar lo que aprendí durante todos estos años, y por la buena onda y comprensión de todos los días.

A Ceci García por haberme acompañado en las mañanas de laboratorio y hacerlas más divertidas con sus anécdotas.

A mis compañeras de la carrera, especialmente a Vale, Flor y Anto por bancarme tanto y acompañarme más que nada en esta última etapa tan esperada y compleja a la vez.

A mis amigas que me apoyaron a lo largo de estos años.

A mi familia por estar desde siempre a mi lado, y confiar en que yo podía.

A mis abuelas por quererme tanto, por expresarme siempre que mis logros son sus logros, y por estar a esta altura de su vida con más ansiedad que yo porque llegue este momento para poder festejarlo conmigo.

A mi hermano Nacho, quien se convirtió en mi mejor amigo, por nunca dejar de apoyarme, por tener siempre las palabras justas y por sacarme sonrisas en momentos no tan lindos.

A mis padres por darme la oportunidad de estudiar lo que me gusta a pesar de que ellos no pudieron, por aguantar mis llantos y mis alegrías durante todos estos años, y por estar para mí y para mi hermano incondicionalmente.

Y a mi novio, por estar a mi lado desde el inicio de la carrera, acompañarme en todas las crisis pre y post examen, por siempre darme su apoyo y por jamás dudar de que este día iba a llegar.

Gracias a todos, esta tesina es un pedacito de cada uno.

Al tata Wilson

Introducción

1. Importancia de la biocatálisis

Las enzimas son los catalizadores de las reacciones de los sistemas biológicos; tienen un extraordinario poder catalítico, generalmente muy superior al de los catalizadores sintéticos o inorgánicos. Poseen un elevado grado de especificidad respecto a sus sustratos, aceleran 10^5 a 10^7 veces las reacciones químicas y funcionan en soluciones acuosas en condiciones muy suaves de temperatura y pH. Se conocen muy pocos catalizadores no biológicos que tengan estas propiedades. Con la excepción de un pequeño grupo de moléculas de ARN catalítico, todas las enzimas son proteínas y su actividad catalítica depende de la integridad de su conformación proteica nativa. (1)

Las enzimas como biocatalizadores han cobrado suma importancia en los últimos años en diversas áreas como la industria farmacéutica, papelera, cosmética, alimenticia, síntesis orgánica, producción de detergentes y obtención de biocombustibles. Las ventajas que los procedimientos biocatalíticos tienen sobre los químicos se basan en que las reacciones catalizadas por enzimas son frecuentemente regio, quimio y estereoselectivas. Además, las reacciones enzimáticas presentan bajo impacto medioambiental debido a que suponen una disminución de los residuos generados y las emisiones, resultando esto importante para el desarrollo de tecnologías más sustentables. (2) (3)

2. Generalidades de lipasas y esterases

Las lipasas (EC 3.1.1.3) y esterases (EC 3.1.1.1) pertenecientes a la familia de las α/β -hidrolasas son enzimas que hidrolizan los carboxil-ésteres en acilglicéridos. Han recibido una considerable importancia en los últimos años debido a dos razones principales: su amplia distribución en la naturaleza, y por pertenecer a uno de los mayores grupos de biocatalizadores para síntesis química, con múltiples preparaciones comerciales disponibles para uso industrial.

La principal diferencia entre lipasas y esterases radica en el largo del grupo acilo, mientras que las primeras prefieren acil-ésteres de cadena larga, insolubles en medio acuoso, las segundas en dichas condiciones son inactivas, pero sí pueden hidrolizar acil-ésteres de cadena corta, solubles en agua. (4)

Se ha visto que ambos tipos de enzimas son capaces de catalizar la hidrólisis y síntesis de un amplio rango de compuestos similares, incluidos ésteres y amidas. (4)

Además, bajo ciertas condiciones, pueden catalizar otras reacciones, incluyendo esterificación, transesterificación, interesterificación, acidólisis, aminólisis, alcoholisis, adición de Manich, síntesis de heterociclos, reacciones tipo Hantzsch, entre otras. (4) (5)

Las lipasas son la clase de enzimas más utilizada en la síntesis orgánica. La disponibilidad de un gran número de preparaciones comerciales, su amplia regio- quimio y estéreo-especificidad y relativa buena estabilidad en medios que contienen disolventes orgánicos han sido factores contribuyentes para esto. (6)

2.1 Estructura y mecanismo de acción de las lipasas

Desde el punto de vista estructural las lipasas pertenecen a la familia α/β -hidrolasas, que se caracteriza por presentar ocho hojas β mayormente paralelas rodeadas por α -hélices (**Figura 1**)

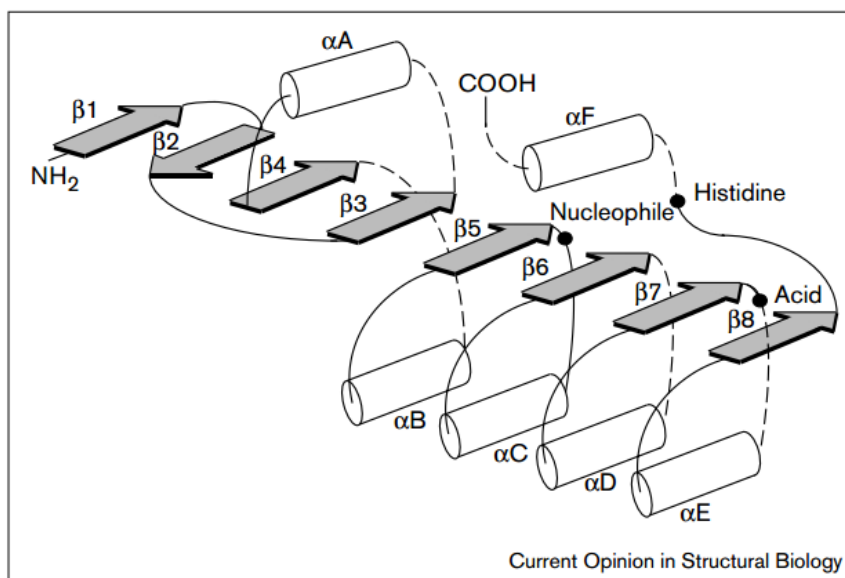


Figura 1: Diagrama de la estructura secundaria canónica de las α/β hidrolasas. Las hélices α y las hebras β están representadas por cilindros blancos y flechas grises, respectivamente. La ubicación de la triada catalítica está indicada por puntos negros. (7)

El sitio activo de las lipasas es muy conservado y está formado por una triada catalítica que consiste en un residuo de serina, histidina, y ácido aspártico o glutámico. (6) El residuo serina se encuentra en un motivo altamente conservado que es el pentapéptido Gly-X-Ser-X-Gly (donde X puede ser cualquier aminoácido); este residuo serina es altamente nucleofílico y se encuentra en el loop entre una hebra β y una α -hélice, formando un motivo β -giro- α llamado “codo nucleofílico”. La estructura rígida que

presentan las lipasas permite que sean estables a altas temperaturas, posibilitando su aplicación en diversos procesos de síntesis.

En el sitio activo se distinguen dos regiones, una región conservada que une un grupo alcohol y es similar en todas las lipasas, y una región ampliamente variable que interacciona con el ácido y determina la especificidad por sustrato que presenta la enzima. (8)

El mecanismo de acción de las lipasas consiste en un ataque nucleofílico del átomo de oxígeno del grupo hidróxilo del residuo serina al átomo de carbono del grupo carbonilo que forma parte del enlace éster del sustrato. Esto resulta en la formación de un intermediario tetraédrico que luego pierde una molécula alcohol para formar un intermediario acil-enzima (**Figura 2A**). Por último, en una reacción de hidrólisis, un nucleófilo ataca al complejo acil-enzima liberando una molécula de ácido y la enzima en su forma nativa (**Figura 2B**). (6)

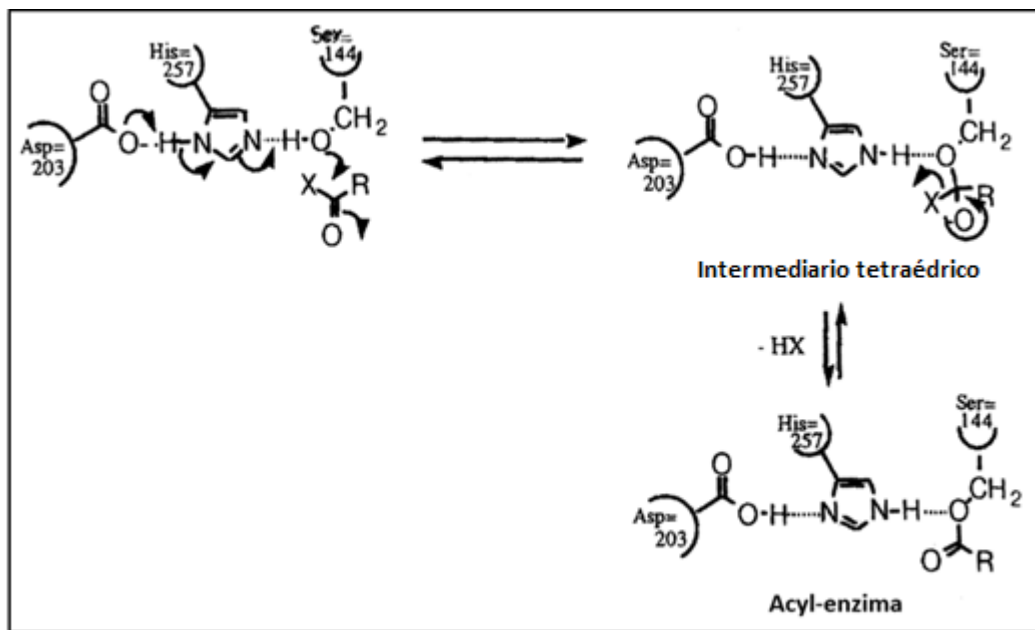


Figura 2A: Formación del complejo acil-enzima. (9)

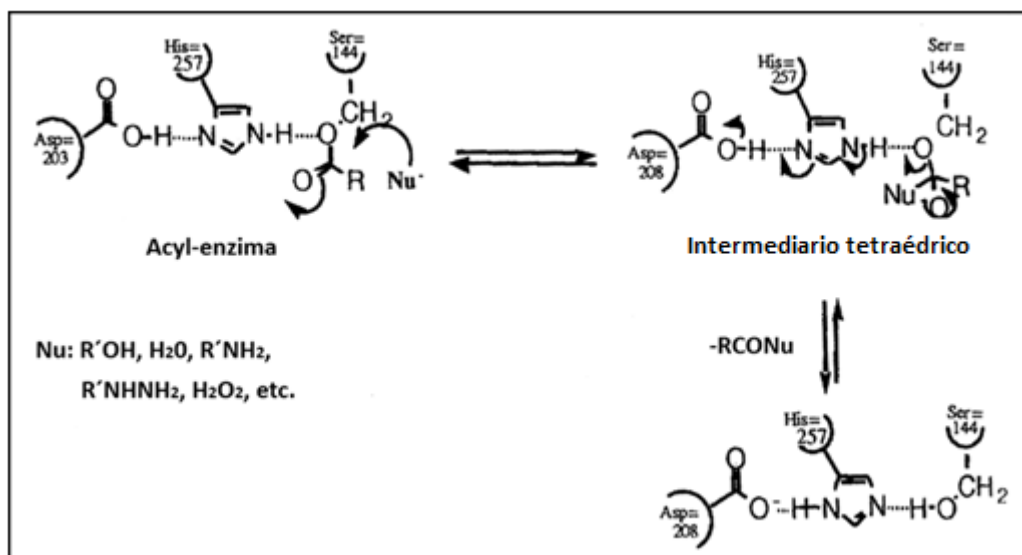


Figura 2B: Reacción de amidación, hidrólisis o transferencia de grupo acilo. (9)

Se ha observado que, en presencia de una interfase acuosa, muchas lipasas sufren un cambio conformacional que provoca un incremento de la actividad. Este fenómeno es como “activación interfacial”. Gracias a la cristalografía de rayos X se determinó que estas enzimas poseen una tapa formada generalmente por fragmentos α -hélice que cubren el sitio activo. La hipótesis planteada es que durante la activación interfacial la tapa se desplaza, permitiendo el acceso del sustrato al sitio activo. En presencia de una superficie hidrofóbica, la tapa de la lipasa se mueve y convierte la forma “cerrada” de la enzima en su forma “abierta”, permitiendo la interacción entre su cara interna hidrofóbica y los residuos hidrofóbicos que generalmente rodean el centro activo de la lipasa con el sustrato. (6)

2.2 Propiedades bioquímicas de las lipasas

Las lipasas dependiendo de su origen presentan gran variedad en sus características bioquímicas en relación a temperatura y pH óptimos de actividad enzimática, metales iónicos activadores, estabilidad térmica y al pH, etc. Dentro de ellas se han encontrado una gran diversidad de lipasas que presentan propiedades enzimáticas extremas como ser psicrófilas, termo e hipertermofílicas, alcalo e hiperalcalofílicas, acidofílicas. (10) (11). Estas características han permitido que las lipasas sean del tipo de enzimas más utilizadas por la industria.

2.3 Aplicaciones industriales de las lipasas

La elevada estabilidad de algunas lipasas en condiciones extremas de pH, temperatura, o en presencia de solventes orgánicos, además de su gran versatilidad catalítica ubica a las lipasas como una herramienta muy valiosa en la biocatálisis. Esto ha permitido su aplicación en un amplio espectro de procesos industriales. (12) (13)

En la industria alimenticia se emplean lipasas, por ejemplo, para dar sabor a los productos lácteos llevando a cabo una hidrólisis selectiva de triglicéridos que genera ácidos grasos que actúan como precursores del sabor. (14)

El biodiesel se genera químicamente usando aceite de varias plantas. La conversión de aceite vegetal a alcohol-éster de cadena corta puede ser catalizada en una transesterificación de un solo paso usando lipasas en solvente orgánico.

En la producción de fragancias se usa la lipasa de *Burkholderia cepacia* para generar la forma enantioméricamente pura de (-)-mentol éster a través de una transesterificación de (±)-mentol. El producto final, mentil metacrilato es polimerizado para ser usado como perfume de liberación sostenida. (15)

3. Importancia de los compuestos ópticamente puros en la industria farmacéutica

Cerca de la mitad de las drogas que se comercializan en la actualidad son compuestos quirales. A pesar de que los enantiómeros tienen la misma estructura química, la mayoría tiene diferencias en su actividad biológica, incluyendo la actividad farmacológica, toxicológica, farmacocinética, metabólica, etc.

Esto se debe a que los diferentes enantiómeros pueden tener diferentes interacciones con compuestos quirales como enzimas, proteínas, receptores, etc., lo que puede llevar a diferentes acciones dentro del organismo. Esto hace que en el organismo se reconozcan los enantiómeros de una misma molécula como dos compuestos totalmente diferentes, generando respuestas diferentes.

Por estén motivo, es importante lograr la separación de dichos enantiómeros y eliminar aquel cuya actividad biológica no es de interés, de forma de encontrar el tratamiento que sea más óptimo para el paciente. (16)

Esto puede lograrse por síntesis química o quimio-enzimática. La ventaja de la síntesis quimio-enzimática sobre la puramente química radica en que puede llevarse a cabo en condiciones menos extremas, evitando problemas de isomerización, racemización, epimerización y rearreglos. (17)

La lista de compuestos farmacéuticos sintetizados con la ayuda de enzimas es creciente, e incluye agentes antivirales, anti cancerígenos, antipsicóticos, anti arritmia, bloqueadores de canales de calcio, radiotrazadores, entre otros. (18)

4. Síntesis de L-deuterodeprenil

El presente trabajo está enmarcado dentro de un proyecto para la síntesis de radiotrazadores quirales de utilidad en tomografía de emisión de positrones (PET), a cargo de la Dra. Sonia Rodríguez. Este trabajo se realiza en cooperación con el Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM). El compuesto L-Deuterodeprenil es un radiotrazador utilizado para la evaluación *in-vivo* de patologías neurológicas que implican la sobreexpresión de la MAO-B en casos de astrocitosis. En la actualidad, este radiotrazador se sintetiza por síntesis química a partir de L-anfetamina en el CUDIM. Teniendo en cuenta el carácter regio, quimio y estereoselectivo de las lipasas, se propone llevar a cabo la reacción indicada en rojo en la **Figura 3** perteneciente a la síntesis del L-deuterodeprenil con un método biocatalítico.

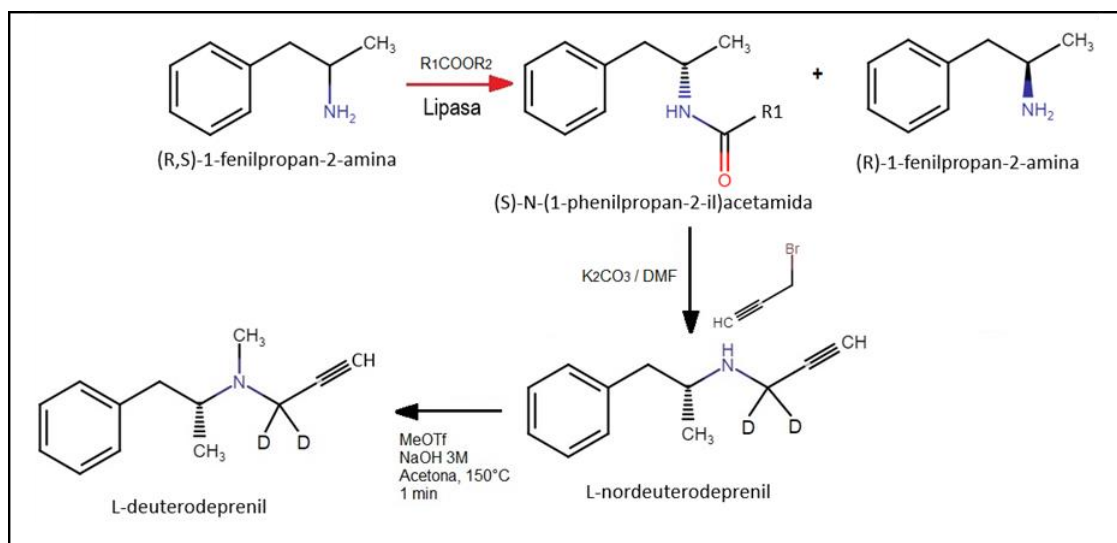


Figura 3: Síntesis de L-deuterodeprenil a partir de anfetamina utilizando una lipasa como catalizador.

La anfetamina es una molécula quiral, cuya configuración óptica puede presentarse en forma de enantiómeros activos levógiros o dextrógiros. La dexanfetamina (isómero óptico dextrógiro de la molécula) es responsable casi plenamente de la actividad farmacológica del compuesto.

Como se observa en la **Figura 3** a partir de la dextroanfetamina y mediante un paso de síntesis química se obtiene el precursor L-nordeuterodeprenil, y por último en una segunda reacción química se obtiene el L-deuterodeprenil.

Por lo tanto, el rol de la lipasa en este proceso de síntesis es resolver la mezcla racémica de la anfetamina de partida, mediante aminólisis enantioselectiva dejando la dextroanfetamina sin reaccionar.

Dado que en Uruguay la tenencia y uso de anfetaminas está regulado (Decreto N° 128/016, Resolución IAU N° 10/2018), en este trabajo se emplearán otras aminas comerciales como sustrato modelo. En este caso se utilizaron α -metilbencilamina y 1-metil-3-fenilpropilamina (**Figura 4**).

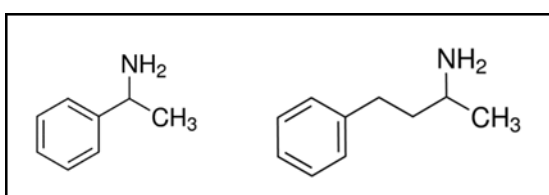


Figura 4: α -metilbencilamina (izquierda) y 1-metil-3-fenilpropilamina (derecha).

Objetivos

1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es la evaluación de la capacidad de dos lipasas microbianas (*Geobacillus thermocatenulatus* y de *Pseudomonas fluorescens*) de conducir la reacción de interés, la aminólisis de un éster carboxílico.

2. Objetivos específicos

- Producción y purificación de las lipasas BTL2 de *Geobacillus thermocatenulatus* y PFE de *Pseudomonas fluorescens*.
- Caracterización bioquímica de las enzimas purificadas:
 - Determinación de pH óptimo y temperatura óptima.
 - Estudio de la actividad enzimática en presencia de metales
 - Estudio de la estabilidad a diferentes pH y temperaturas de trabajo.
 - Estudios de estabilidad en presencia de solventes.
- Determinación de parámetros cinéticos K_m y V_{max} .
- Screening de actividad sobre, α -metilbencilamina y 1-metil-3-fenilpropilamina.

Materiales y métodos

1. Materiales microbiológicos

1.1 Cepas de *Escherichia coli*

Mutante	Cepa base	Vector	Origen
1	<i>Escherichia coli</i> TOP 10	pET-22b con inserto PFE I	Thermo Fisher Scientific
2	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	pET-22b con inserto PFE I	Thermo Fisher Scientific
3	<i>Escherichia coli</i> TOP 10	pBTL1 con inserto BTL-2	Thermo Fisher Scientific
4	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	pBTL1 con inserto BTL-2	Thermo Fisher Scientific

Las cepas recombinantes de *E. coli* TOP 10 (+) y BL21 DE3 (+) transformadas con el vector pET-22b conteniendo el gen de la esterasa PFE y con el vector pBTL1 conteniendo el gen de la lipasa BTL2 fueron desarrolladas y cedidas al grupo de trabajo para la realización de esta tesina por el Dr. Fernando López Gallego del Centro de Investigación Cooperativa en Biomateriales de San Sebastián, España. (Ver **Anexo**)

1.2 Medios de cultivo y soluciones

- Medio Lysogeny Broth (LB) agar

Cloruro de sodio	10 g
Extracto de levadura	5 g
Peptona	10 g
Agar	15 g
Agua destilada (csp)	1,0 L

- Medio Lysogeny Broth (LB)

Cloruro de sodio	10 g
Extracto de levadura	5 g
Peptona	10 g
Agua destilad (csp)	1,0 L

- Buffer fosfato de sodio, 25 mM, pH 7,0:

Fosfato de sodio dibásico	3,549 g
Fosfato de sodio monobásico	2,3 g
Agua destilada (csp)	1,0 L

- Buffer tris-ácido bórico-ácido acético (ATB), 50 mM:

Ácido acético	2,94 mL
Ácido bórico	3,08 mL
Tris	6,06 g
Agua destilada (csp)	1,0 L

- Azul de Coomassie 5% stock, 10 mL:

Azul de Coomassie G-250	0,5 g
Agua destilada (csp)	10 mL

- Azul de Coomassie coloidal G-250 solución de tinción stock:

Sulfato de amonio	50 g
Ácido fosfórico 85%	6 mL
Azul de Coomassie 5% stock	10 mL
Agua destilada (csp)	500 mL

- Azul de Coomassie coloidal:

Metanol	100 mL
Azul de Coomassie coloidal G-250 solución de tinción stock	400 mL

- Solución de fijación:

Etanol 98%	400 mL
Ácido acético	100 mL
Agua destilada (csp)	1,0 L

- Gel homogéneo 12,5% para SDS-PAGE:

Agua destilada	5,134 mL
Buffer Tris-HCl 0,5 M	6 mL
SDS 20%	24 µL
Solución acrilamida-bisacrilamida 30%	12,5 mL
Tetrametiletilendiamina	6 µL
Persulfato de sodio 0,1 g/mL	240 µL

- Gel homogéneo 15% para SDS-PAGE:

Agua destilada	5,75 mL
Buffer Tris-HCl 0,5 M	6 mL
SDS 20%	120 µL
Solución acrilamida-bisacrilamida 30%	11,976 mL
Tetrametiletilendiamina	6 µL
Persulfato de sodio 0,1 g/mL	240 µL

- Gel stacking 5% para SDS-PAGE:

Agua destilada	3.26 mL
Buffer Tris-HCl 0,5 M	624 µL
SDS 20%	24 µL
Solución acrilamida-bisacrilamida 30%	816 µL
Tetrametiletilendiamina	4,2 µL
Persulfato de sodio 0,1 g/mL	48 µL

- Buffer Tris-HCl 1,5 M:

Tris	36,342 g
Agua destilada (csp)	200 mL

- Solución acrilamida-bisacrilamida 30%:

Acrilamida	58,4g
Bisacrilamida	1,6 g
Agua destilada (csp)	200 mL

- Buffer de muestra:

Buffer Tris-HCl 500 mM pH 6,7	11,25 mL
SDS	1,8 g
β -mercaptoetanol	0,9 mL
EDTA	17 mg
Glicerol	9 mL
Azul de bromofenol	0,12 g
Agua destilada (csp)	30 MI

2. Métodos

2.1 Producción de estearasa I de *Pseudomonas fluorescens* (PFE I)

A partir de stock, almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, de la cepa de *E. coli* BL21(DE3) transformada con el plásmido que contiene el gen codificante para PFE I se realizó un cultivo en placa con medio LB agar suplementado con $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ de ampicilina y se incubó durante 24 hs a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se realizó el precultivo inoculando una colonia fresca en 5 mL de medio LB suplementado con $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ de ampicilina y se incubó 15 hs a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación a 170 rpm. Se inocularon 20 mL de medio LB suplementado con $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ de ampicilina con $200\text{ }\mu\text{L}$ de precultivo fresco y se incubó a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación a 170 rpm hasta alcanzar un valor de densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0,5. Se indujo la expresión proteica suplementando el medio con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) de manera de alcanzar una concentración final 5 mM, y se incubó overnight a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación. Se centrifugó la muestra durante 10 minutos, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 8000 rpm, a partir de donde se conservó el pellet y se descartó el sobrenadante.

2.2 Purificación de estearasa I de *Pseudomonas fluorescens* (PFE I)

Se resuspendió el pellet de células en buffer fosfato de sodio 25 mM, 10 mM imidazol, pH 7,0 suplementado con lisozima hasta concentración $30\text{ }\mu\text{g/mL}$. Se sonicaron las células en 5 rondas de 1 minuto on, 2 minutos off en baño de hielo, a 20% de amplitud. Se centrifugó durante 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, y 9000 rpm a partir de lo que se logró la separación de la fracción soluble de proteínas (sobrenadante) de la fracción insoluble (pellet).

2.3 Producción lipasa 2 de *Geobacillus thermocatenulatus* (BTL2)

A partir de un stock, almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, de la cepa de *E. coli* transformada con el plásmido pBTL1 que contiene el gen de la lipasa de *Geobacillus thermocatenulatus* se

realizó un cultivo en placa con medio LB agar suplementado con 100 µg/mL de ampicilina. Se incubó durante 24 hs a 37 °C. A partir de una colonia fresca se inocularon 5 mL de medio LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y se incubaron 15 horas a 37 °C en agitación a 170 rpm. Posteriormente, se inocularon 100 mL de medio LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina, con 1 mL de precultivo fresco y se incubaron a 28 °C en agitación a 170 rpm hasta alcanzar un valor de densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,5. Se indujo la expresión proteica incubando durante 15 horas a 42 °C con agitación a 170 rpm. Por último, se centrifugó la muestra durante 15 minutos, a 4 °C y 10000 rpm. Se conservó el pellet, y se descartó el sobrenadante.

2.4 Purificación de lipasa 2 de *Geobacillus thermocatenulatus* (BTL-2)

Se resuspendió el pellet de células, obtenido previamente, en buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0 suplementado con lisozima 30 µg/mL. Se sonicaron las células en 5 rondas de 1 minuto on, 2 minutos off en baño de hielo, a 20% de amplitud. Se centrifugó durante 15 minutos, a 4 °C y 10000 rpm y posteriormente se separó la fracción soluble de proteínas (sobrenadante) de fracción insoluble (pellet).

Se incubó la fracción soluble con 1,0 g de octil-agarosa *filtered dried* equilibrada en buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0 con agitación suave en rotor durante 1 hora. Pasado este tiempo se descartó el percolado. Se lavó la columna con buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0 con el mismo volumen de fracción soluble y se incubó en rotor durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante (repetir 2 veces). La proteína adsorbida se eluyó utilizando buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0 suplementado con Tritón X-100 2%, en un volumen igual a la mitad del volumen aplicado inicialmente. Se incubó durante 90 minutos en rotor a temperatura ambiente y se obtuvo el eluido.

El eluido obtenido de la octil-agarosa se incubó con 1,0 g de dietilaminoetil-agarosa (DEAE-agarosa) *filtered dried* equilibrada en buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0, con agitación suave en rotor durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se separó el percolado del gel mediante filtración por gravedad. El soporte se lavó con buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0 suplementado con Tritón 2% incubando durante 30 minutos con agitación en rotor. Se realizaron lavados hasta no detectar presencia de actividad enzimática. Por último, se eluyó la proteína adsorbida al intercambiador con buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0 suplementado con NaCl 1 M, incubando durante 30 minutos agitando en rotor.

2.5 Ensayo de actividad de lipasa 2 de *Geobacillus thermocatenulatus*

Se midió actividad enzimática empleando p-nitrofenil butirato (p-NPB) como sustrato. La mezcla de reacción contiene 1 mL de sustrato (0,5 mM p-nitrofenil butirato

en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0) y 20 μ L de enzima en una dilución apropiada en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0. Se determinó la velocidad de formación de p-nitrofenol (p-NP) a temperatura ambiente por medida espectrofotométrica a 348 nm.

Definición de unidad de enzima: *cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de p-NP por minuto a pH 7,0 y temperatura ambiente.*

2.5.1 Ensayo de actividad de lipasa CAL-B

Se midió actividad enzimática empleando p-nitrofenil butirato (p-NPB) como sustrato. La mezcla de reacción contiene 2 mL de sustrato (0,5 mM p-nitrofenil butirato en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0 suplementado con Tritón X-100 al 0,02%) y 10 mg de CAL-B. Se determinó la velocidad de formación de p-nitrofenol (p-NP) a temperatura ambiente por medida espectrofotométrica a 348 nm bajo agitación debido a que la enzima se encuentra inmovilizada.

Definición de unidad de enzima: *cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de p-NP por minuto a pH 7,0 y temperatura ambiente.*

2.6 Determinación del coeficiente de extinción molar (ϵ) de p-NP a 340 nm en función del pH

Se preparó p-NP a diferentes concentraciones en buffer tris-boro-acético (ATB) 50 mM a diferentes valores de pH entre 3 y 10. Se midió Abs_{348nm} de las mezclas reactivas.

2.7 Determinación de pH óptimo

Se realizó la medida de actividad tal como fue descrita en el ítem 2.5 utilizando el sustrato preparado en buffer ATB 50 mM a diferentes valores de pH entre 3 y 10.

2.8 Determinación de temperatura óptima

Se realizó la medida de actividad tal como fue descrita en el ítem 2.5 incubando la mezcla de reacción a diferentes temperaturas entre 20 y 75 °C. Para ello se circuló agua termostaticada a través de una camisa que recubre la celda de medida del espectrofotómetro y se termostaticó el sustrato previo a iniciar el ensayo de actividad.

2.9 Efectos de la concentración de Tritón X-100 en la actividad enzimática

Se preparó buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0 suplementado con Tritón X-100 en diferentes concentraciones entre 0,01% y 1% v/v. Se realizó la medida de actividad enzimática tal como fue descrito en el ítem 2.5, usando el sustrato preparado a partir de buffer fosfato de sodio suplementado con Tritón X-100 en diferentes concentraciones.

2.10 Efecto de los metales sobre la actividad enzimática

Se preparó buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0 suplementado con sales de los diferentes iones metálicos en concentración 1 mM, 10 mM y 20 mM. Se realizó la medida de actividad enzimática tal como fue descrito en el ítem 2.5, usando el sustrato preparado en buffer fosfato de sodio suplementado. Las sales empleadas en este trabajo fueron: NaCl, K₂SO₄, CaCl₂, ZnSO₄, MnCl₂, CoCl₂, MgSO₄, NiSO₄ y CuSO₄.

2.11 Estudio de estabilidad con la temperatura

La lipasa BTL-2 (70 UE/mL) se incubó en buffer fosfato de sodio 25mM pH 7,0 durante una hora a cada temperatura que se desea evaluar la estabilidad. Luego de una hora de incubación se colocó cada alícuota de enzima en un baño de agua y hielo durante un tiempo suficiente hasta llegar a temperatura ambiente. Se realizó la medida de actividad enzimática tal como ya fue descrito en el ítem 2.5.

2.12 Estudio de estabilidad con el pH

La lipasa BTL-2 (140 UE/mL) se incubó en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0 diluido al medio en buffer ATB 50 mM a diferentes pH entre 4 y 10 durante 24 hs a temperatura ambiente. Luego de transcurrido el tiempo de incubación se realizó la medida de actividad enzimática tal como ya fue descrito en el ítem 2.5. El pH final de la mezcla de reacción está determinado por el pH de la solución de pNPB, pH 7,0.

2.13 Determinación de parámetros cinéticos

Se preparó sustrato a diferentes concentraciones entre 0,125 mM y 2 mM en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0 y se midió la actividad enzimática tal como ya fue descrito en el ítem 2.5 utilizando el sustrato en las diferentes concentraciones. Se determinaron los parámetros cinéticos Km y Vmax utilizando la lineación de Lineweaver-Burk de la ecuación de Michaelis-Menten.

2.14 Estudio de estabilidad en solventes orgánicos

Se prepararon mezclas de solución de enzima en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0 conteniendo 300 UE/mL y diferentes solventes orgánicos, en las siguientes proporciones 1:2, 1:5, 1:10 y 1:20 (v/v). Los solventes orgánicos utilizados fueron: 1,4-dioxano, diglyme y polietilenglicol. Las mezclas fueron incubadas a temperatura ambiente a partir de lo que se tomaron alícuotas a tiempo cero, 1 y 24 hs. Se determinó la actividad enzimática remanente tal como ya fue descrito en el ítem 2.5.

2.15 Síntesis enzimática de acetato de 1-metil-3-fenilpropilamina

Se colocaron en un recipiente 330 μL de 1-metil-3-fenilpropilamina, 195 μL de acetato de etilo, 56,4 UE de CAL-B u 8,7 UE de BTL-2 y 50 mg de tamices moleculares (4 Å). La mezcla de reacción fue incubada a temperatura ambiente o a 47 °C en agitación durante 72 hs. Los productos de reacción fueron evaluados por cromatografía en capa fina (TLC) empleando como fase móvil una mezcla de hexano y acetona en proporción 1:1, revelando con permanganato de potasio y ninhidrina. (19)

2.15.1 Síntesis enzimática de acetato de α -metilbencilamina

Se colocaron en un recipiente 260 μL de α -metilbencilamina, 195 μL de acetato de etilo, 56,4 UE de CAL-B u 8,7 UE de BTL-2 y 50 mg de tamices moleculares (4 Å). La mezcla de reacción fue incubada a temperatura ambiente o a 47 °C en agitación durante 72 hs. Los productos de reacción fueron evaluados por cromatografía en capa fina (TLC) en las mismas condiciones detalladas en 2.15

2.16 Hidrólisis de acetato de 1-metil-3-fenilpropilamina

Se colocaron en un recipiente 450 μL de acetato de 1-metil-3-fenilpropilamina 174 mM en acetato de etilo, 50 μL buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0 y 13 UE de CAL-B. Para el caso de la lipasa BTL-2 se sustituyen los 50 μL buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0 por 50 μL de la enzima en solución, conteniendo 16 UE. La mezcla de reacción se incubó a 70 °C en presencia de CAL-B y a 40 °C en presencia de BTL-2, en agitación durante 72 hs. Los productos de reacción fueron evaluados por cromatografía en capa fina (TLC) en las mismas condiciones detalladas en 2.15

2.16.1 Hidrólisis de acetato de α -metilbencilamina

Se colocaron en un recipiente 450 μL de acetato de α -metilbencilamina 200 mM en acetato de etilo, 50 μL buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0 y 13 UE de CAL-B. Para el caso de la lipasa BTL-2 se sustituyen los 50 μL buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0 por 50 μL de la enzima en solución, conteniendo 16 UE. La mezcla de reacción se incubó a 70 °C en presencia de CAL-B y a 40 °C en presencia de BTL-2, en agitación durante 72 hs. Los productos de reacción fueron evaluados por cromatografía en capa fina (TLC) en las mismas condiciones detalladas en 2.15.

Resultados y discusión

Producción y purificación de estearasa I de *Pseudomonas fluorescens* (PFE I)

Inicialmente en este trabajo se llevó a cabo la purificación de esterasa I de *Pseudomonas fluorescens* para su posterior caracterización, realizándose la inducción de la expresión proteica y posterior evaluación de la expresión mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

En primer lugar, se intentó producir la proteína de interés a partir de células competentes BL21(DE3) de *E. coli* transformadas con plásmido que contiene el gen codificante para PFE I. Se evaluó la expresión proteica a distintos tiempos para lo cual se tomaron muestras a tiempo 0, 5 y 24 horas de incubación. La expresión de proteínas se evaluó mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

Debido a que en los ensayos anteriores no se observó sobreexpresión de PFE I en la fracción soluble, se decidió extraer y purificar el ADN de células TOP10 de *E. coli* transformadas con el vector pET-22b, que contiene el gen que codifica para la proteína de interés. A partir de este ADN purificado se transformaron nuevas células competentes BL21(DE3) de *E. coli* de las cuales se seleccionaron 10 clones elegidos al azar, obtenidos luego de la transformación, y se realizó el protocolo de purificación descrito en la sección 2.2 de materiales y métodos. Se realizaron los ensayos electroforéticos de las proteínas presentes en el sobrenadante luego de hacer la lisis de las células (fracción soluble) de los 10 clones y en todos los casos se observó ausencia de sobreexpresión de proteínas con el peso molecular buscado (entre 30 kDa y 45 kDa) (20) por lo que se decidió analizar las fracciones insolubles de los mismos 10 clones. En la **Figura 1** se muestran los resultados obtenidos para uno de los clones pero es representativa de los 10 clones analizados.

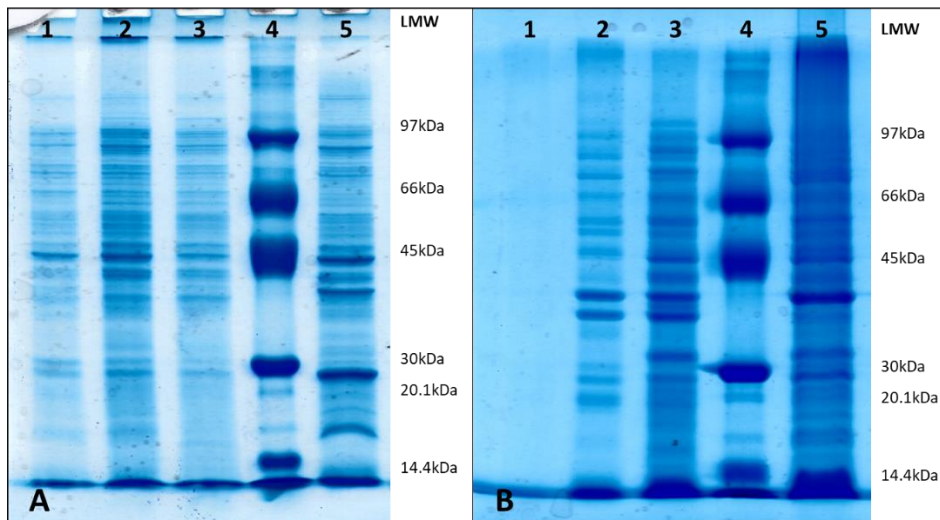


Figura 1: Electroforesis en gel de poliacrilamida 15% de fracción soluble e insoluble de clon 6. A: 1: Fracción soluble a tiempo cero de inducción de expresión, 2: Fracción soluble luego de 5 hs de inducción de expresión, 3: Fracción soluble luego de 24 hs de inducción de expresión. 4: Marcador de peso molecular (low molecular weight), 5: Fracción soluble de control negativo de expresión. **B:** 1: Fracción insoluble a tiempo cero de inducción de expresión, 2: Fracción insoluble luego de 5 hs de inducción de expresión, 3: Fracción insoluble luego de 24 hs de inducción de expresión, 4: Marcador de peso molecular (low molecular weight), 5: Fracción insoluble de control negativo de expresión.

Se evidenció la presencia de una proteína de aproximadamente 40 kDa (20) en las fracciones insolubles de todos los clones analizados que podría corresponder a PFE I ya que no está presente en el control negativo de expresión. A partir de estos resultados podemos concluir que la posible proteína de interés (PFE I) se expresa probablemente en forma de cuerpos de inclusión.

Debido a que los procesos de purificación de proteínas a partir de los cuerpos de inclusión suelen ser largos y de bajo rendimiento, se decidió seguir con la producción y purificación de la otra lipasa propuesta.

Producción y purificación de lipasa BTL-2 de *Geobacillus thermocatenulatus*

Se llevó a cabo la producción y purificación de lipasa BTL-2 de *Geobacillus thermocatenulatus* para su posterior caracterización.

La proteína de interés se produjo a partir de células competentes BL21 (DE3) de *E. coli* transformadas con el vector pBTL1 conteniendo el gen codificante para BTL-2. Uno de mis tutores, BC Agustín Castilla, durante una pasantía en el laboratorio del Dr. Fernando López Gallego en el año 2018, estuvo trabajando en la optimización de las condiciones de expresión por lo que ya contaba con la información de que la proteína

de interés se expresaba en la fracción soluble (A. Castilla, comunicación personal, 12 de setiembre de 2019).

En base a esto, se procedió a la purificación del sobrenadante obtenido por centrifugación de las células sonicadas. La misma se llevó a cabo mediante una cromatografía de interacción hidrofóbica en Octil-agarosa seguida por una cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sepharose, tal como se describió en la sección 2.4 de materiales y métodos.

El proceso de purificación fue evaluado mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 2**.

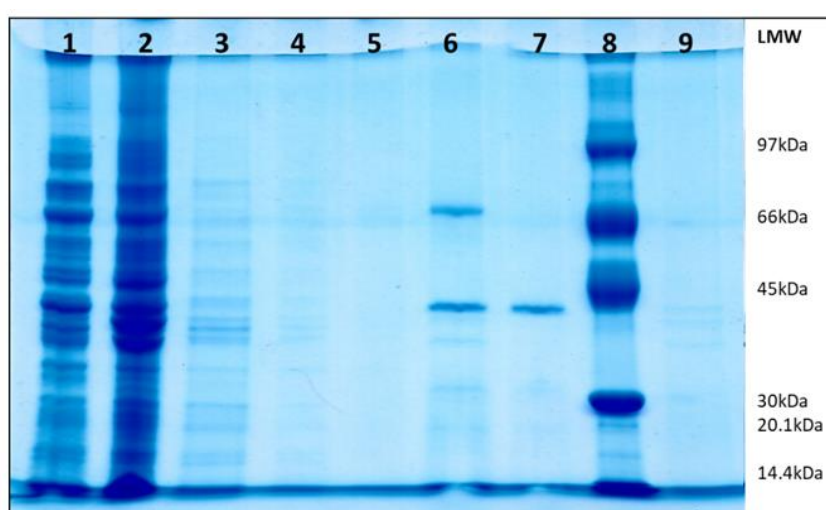


Figura 2: Ensayo de electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) en gel de poliacrilamida 15% correspondiente al proceso de purificación de BTL-2. De izquierda a derecha: 1: Fracción soluble. 2: Fracción insoluble. 3: Percolado de Octil-agarosa. 4: Lavado 1 de Octil-agarosa. 5: Lavado 2 de Octil-agarosa. 6: Eluido de Octil-agarosa. 7: Percolado de DEAE-Sepharose. 8: Marcador de peso molecular (LMW). 9: Eluido de DEAE-Sepharose.

Además de realizar la electroforesis, se realizaron medidas de actividad de las fracciones obtenidas en el proceso de purificación. En la **Tabla 1** se muestran los resultados de las fracciones donde encontramos la actividad de interés. Los datos correspondientes a todos los pasos de la purificación de adjuntan en el **Apéndice**.

Tabla 1: Tabla de purificación de lipasa BTL-2 de *Geobacillus thermocatenulatus* *medido a $\lambda=348$ nm. ** $\epsilon=5.58 \times 10^{-3} \mu M^{-1}$. Los valores expresados en la tabla corresponden a un proceso de purificación pero son representativos de todos los procesos de purificación realizados, al menos 10 veces.

Fracción	UE/mL**	UE totales	%Recuperación
Fracción soluble	73,84	406,17	100,00
Eluido Octil-agarosa	87,74	241,29	59,41
Percolado DEAE-Sepharose	65,53	180,21	44,37
Lavado 1 DEAE-Sepharose	15,93	43,81	10,79

En la **Figura 2** en el carril 6 correspondiente al eluido de Octil-agarosa se observa una disminución considerable del número de bandas respecto a la muestra inicial, lo que indica que en este paso se eliminaron la mayoría de las proteínas que no son la proteína de interés. Posteriormente, en la cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sepharose se obtiene la proteína de interés de aproximadamente 45 kDa (21) en el percolado, ya que ésta no se adsorbe al intercambiador (carril 7) y se elimina la banda proteica contaminante de aproximadamente 66 kDa que queda adsorbida al intercambiador.

En la **Tabla 1** se muestran los rendimientos de purificación expresados en actividad enzimática para todo el proceso; se observa que en el primer paso de purificación (cromatografía hidrofóbica) se recupera el 59,4% de la actividad aplicada, y en el segundo paso (cromatografía de intercambio iónico), entre la fracción del percolado y el lavado 1 donde se observó la mayor cantidad de UE, se recupera el 55,8 % de la actividad enzimática inicial. En este segundo paso de purificación se recupera el 92,9% de la actividad enzimática observada en el eluido de octil-agarosa, lo cual es un excelente rendimiento, ya que sacrificando solo un 7% de la actividad se obtiene la enzima de interés con el grado de pureza adecuado para proceder a su caracterización bioquímica (carril 7 de la **Figura 2**). A partir de la proteína pura se realizó una diálisis con buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0 para retirar el Tritón X-100 y se procedió a su caracterización bioquímica.

Determinación del coeficiente de extinción molar (ϵ) de p-NitroFenol (pNP) a 348 nm en función del pH

Dado que la velocidad de catálisis se mide a través de la formación del producto pNP en el tiempo, para realizar el estudio de pH óptimo de la actividad enzimática, se debe estudiar primero la influencia del pH en el coeficiente de extinción molar del pNP.

Se siguió el protocolo detallado anteriormente en la sección 2.6 de materiales y métodos. Se utilizó pNP en concentración 10, 20, 30, 40, 50 y 60 μM . Los distintos

valores de pH, así como los valores de ϵ obtenidos en cada condición se encuentran detallados en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Determinación de coeficiente de extinción molar del pNP a diferentes pH

pH	[PNP](μM)	$A_{348 \text{ nm}}$	$A_{348 \text{ nm}}$	$A_{348 \text{ nm}}$ promedio	ϵ (μM^{-1})
3,01	10	0,054	0,054	0,054	0,0056
	20	0,109	0,108	0,108	
	30	0,164	0,164	0,164	
	40	0,217	0,218	0,217	
	50	0,279	0,276	0,277	
	60	0,333	0,336	0,334	
4,01	10	0,060	0,060	0,060	0,0053
	20	0,114	0,115	0,114	
	30	0,168	0,174	0,171	
	40	0,227	0,222	0,224	
	50	0,280	0,278	0,279	
	60	0,320	0,321	0,320	
5,01	10	0,060	0,058	0,059	0,0056
	20	0,114	0,114	0,114	
	30	0,172	0,172	0,172	
	40	0,235	0,230	0,232	
	50	0,279	0,283	0,281	
	60	0,338	0,346	0,342	
6,01	10	0,054	0,055	0,054	0,0055
	20	0,112	0,112	0,112	
	30	0,166	0,165	0,165	
	40	0,216	0,221	0,218	
	50	0,277	0,275	0,276	
	60	0,325	0,332	0,328	
7,02	10	0,058	0,058	0,058	0,0056
	20	0,115	0,118	0,116	
	30	0,176	0,174	0,175	
	40	0,226	0,226	0,226	
	50	0,282	0,282	0,282	
	60	0,338	0,338	0,338	
8,01	10	0,058	0,060	0,059	0,0055
	20	0,118	0,120	0,119	
	30	0,176	0,177	0,176	
	40	0,235	0,235	0,235	
	50	0,295	0,293	0,294	
	60	0,327	0,329	0,328	
9,01	10	0,060	0,06	0,06	0,0056
	20	0,123	0,125	0,124	
	30	0,173	0,178	0,175	

	40	0,229	0,231	0,23	
	50	0,288	0,291	0,289	
	60	0,340	0,339	0,339	
10,01	10	0,063	0,063	0,063	0,0059
	20	0,118	0,125	0,121	
	30	0,181	0,181	0,181	
	40	0,238	0,237	0,237	
	50	0,294	0,298	0,296	
	60	0,357	0,358	0,357	
11,01	10	0,067	0,068	0,067	0,0057
	20	0,126	0,129	0,127	
	30	0,182	0,191	0,186	
	40	0,241	0,242	0,241	
	50	0,296	0,296	0,296	
	60	0,355	0,358	0,356	
ε promedio (μM⁻¹)					0,0056
Desviación estándar					0,0002

Con los resultados obtenidos en la tabla 2 se determinó que el coeficiente de extinción molar para el pNP a 348 nm, temperatura ambiente, en un rango de pH entre 3 y 11 es $(5,58 \pm 0,2) \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}$.

Determinación del pH óptimo de BTL-2

El sustrato fue preparado a pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; y 10,0. No se hicieron ensayos a pH mayores dado que el sustrato sufre auto hidrólisis. En base a los resultados primarios se decidió realizar el ensayo también a pH 7,5, 8,5 y pH 9,5. Se calculó la velocidad de catálisis expresada como $\mu\text{mol pNP}$ generado por minuto por mL de solución de enzima, por mL de solución de enzima y el porcentaje de actividad relativa respecto al pH de referencia elegido (7,0). Los ensayos se hicieron a temperatura ambiente (23 °C). Los resultados se muestran en la **Tabla 3**. Se muestra además el gráfico de porcentaje de actividad relativa vs pH de trabajo en la **Figura 3**.

Tabla 3: Ensayo de pH óptimo. * Porcentaje de actividad relativa respecto al ensayo a pH 7,0.

pH	Velocidad de catálisis ($\mu\text{mol pNP}/\text{min.mL}$)	% Actividad relativa*
3,1	0,00	0,00
4,1	2,57	24,67
5,1	3,42	32,84
6,1	4,41	42,32
7,0	10,41	100,00
7,5	17,15	164,74
8,0	29,42	282,59
8,5	20,42	196,11
9,0	19,79	190,08
9,5	18,98	182,32
10,0	12,22	117,35

Las desviaciones estándar de los resultados mostrados en todos los casos fueron inferiores al 0,1% del valor de la velocidad de catálisis. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

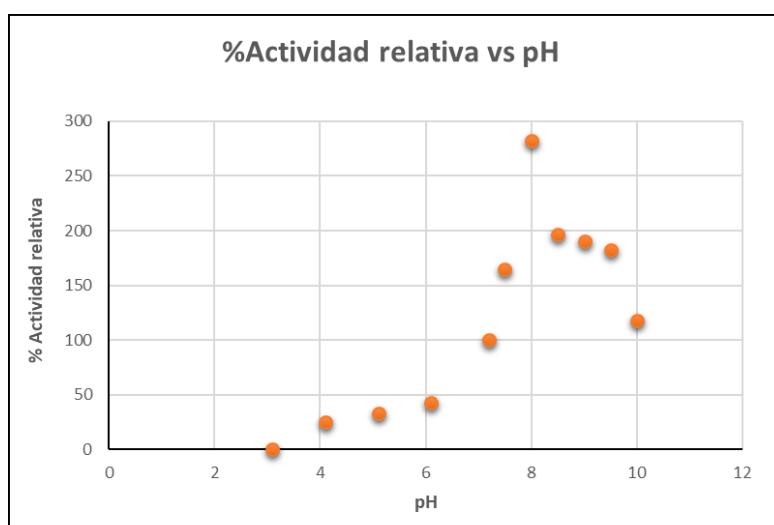


Figura 3: Gráfico de %Actividad relativa vs pH para determinación de pH óptimo.

Se determinó que el pH óptimo de trabajo para la enzima BTL-2 se encuentra entre 7,5 y 9,5 por lo que podemos clasificar a BTL-2 como una lipasa alcalina, mostrando un máximo de catálisis a pH 8,0. El pH óptimo para las lipasas se encuentra generalmente en un rango entre 6 y 10, lo cual se relaciona con su mecanismo catalítico. (22)

Determinación de temperatura óptima de BTL-2

Se trabajó con el protocolo descrito en la sección 2.8 utilizando temperaturas en el rango 20 °C a 75 °C variando la temperatura de a 5 °C. Se calculó la velocidad de catálisis expresada como $\mu\text{mol pNP}$ por minuto por mL de solución de enzima y el porcentaje de actividad relativa respecto a la temperatura de referencia (20 °C). Los resultados se muestran en la **Tabla 4**. Se muestra además el gráfico de porcentaje de actividad relativa vs temperatura del ensayo en la **Figura 4**.

Tabla 4 Ensayo de temperatura óptima. *Valores de velocidad de catálisis y porcentaje de actividad relativa respecto al ensayo a 20 °C.

Temperatura (°C)	Velocidad de catálisis ($\mu\text{mol pNP}/\text{min. mL}$)	% Actividad relativa*
20,0	6,73	100,00
25,5	9,03	134,18
30,8	11,07	164,46
35,5	7,70	114,49
40,0	12,68	188,41
44,5	12,15	180,49
50,0	9,31	138,39
55,0	23,36	347,17
60,0	23,15	344,05
64,5	27,08	402,40
70,0	28,12	417,84
75,0	7,56	112,27

Las desviaciones estándar de los resultados mostrados en todos los casos fueron inferiores al 0,1% del valor de la velocidad de catálisis. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

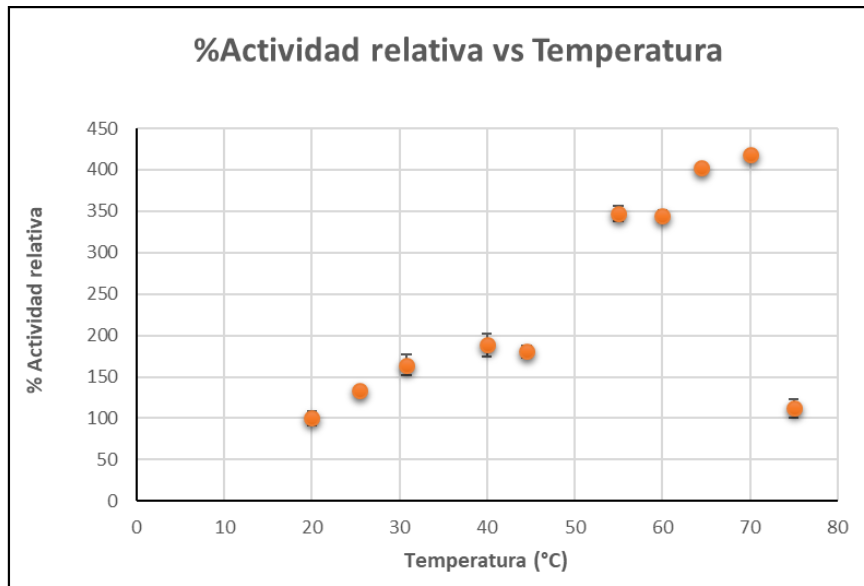


Figura 4: Gráfico de % de actividad relativa vs temperatura de ensayo para la determinación de temperatura óptima.

Los resultados presentados muestran una gran dispersión, en algunos casos no esperada, sin embargo, es claro que a temperaturas por encima de 55 °C la actividad relativa aumenta en un factor de casi 2 veces respecto a temperaturas menores, para luego decaer abruptamente por encima de 70 °C. Debido a que la temperatura óptima de BTL-2 es elevada, podemos considerarla una lipasa hipertermofílica. (23)

En la literatura existen reportes previos en relación a la caracterización de la lipasa de *Geobacillus thermocatenulatus*, y los mismos son concordantes con los obtenidos en esta tesina. (24) (25) En estos reportes se describe que el pH óptimo de la enzima está en un rango de pH entre 8-9, y que la temperatura óptima de la misma esta entre 55 y 75 °C.

Efectos de la concentración de Tritón X-100 en la actividad enzimática

Teniendo en cuenta que anteriormente se han reportado casos de aumento de la actividad enzimática de lipasas debido a la presencia de Tritón X-100, se decidió evaluar el efecto del mismo en la actividad de la lipasa BTL-2.

Los valores de Unidades de enzima y porcentaje de actividad relativa se muestran en la **Tabla 5**. Se toma como 100% la activada enzimática en ausencia de Tritón X-100. Se muestra además el gráfico de porcentaje de actividad relativa vs concentración de Tritón X-100 en la **Figura 5**.

Tabla 5: Efecto del Tritón X-100 sobre la actividad enzimática de BTL-2.

[Tritón X-100] (%v/v)	UE/mL	% Actividad relativa
0,000	36,3	100,0
0,005	48,1	132,6
0,010	66,9	184,7
0,020	72,4	199,7
0,030	67,3	185,7
0,040	42,0	115,9
0,080	30,6	84,4
0,100	5,4	14,9
0,500	3,6	9,8
1,000	1,6	4,3

Las desviaciones estándar de los resultados mostrados en todos los casos fueron inferiores al 0,1% del valor de la velocidad de catálisis. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

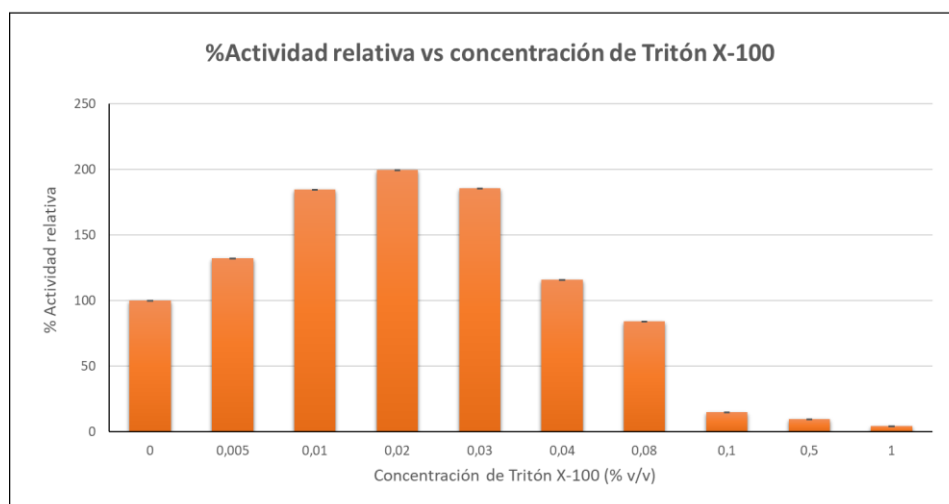


Figura 5: Efecto del Tritón X-100 sobre la actividad enzimática de BTL-2.

Los resultados mostraron que la enzima duplica su actividad en presencia de Tritón X-100 al 0,02%, y disminuye su actividad a concentraciones mayores a 0,04%. Panniza et al (2013) reporta un comportamiento similar para la lipasa LipI3. Se ha reportado que este compuesto en bajas concentraciones reduce la desnaturalización de las lipasas evitando su agregación, y promueve su activación favoreciendo positivamente la interacción enzima-sustrato. Por otro lado, a altas concentraciones de Tritón X-100 la actividad disminuye debido a que se afecta la solubilidad de la enzima y su acción catalítica. (26) (27)

Este resultado sería utilidad en ensayos posteriores ya que, en caso de observar activación, permitiría disminuir la cantidad de enzima utilizado en cada ensayo de actividad, al igual que los tiempos y costos destinados a purificar.

Efectos de la presencia de metales en la actividad enzimática

Se analizó la actividad de la enzima BTL-2 en presencia de sodio, potasio, calcio, zinc, magnesio, cobalto, manganeso, níquel y cobre, para diferentes concentraciones de cada metal (1 mM, 10 mM y 20 mM). Se tomó como valor de referencia la velocidad de catálisis en ausencia de metal. En la **Tabla 6** se muestra el porcentaje de actividad relativa para cada concentración de los diferentes metales. En la **Figura 6** se ilustran estos resultados.

Tabla 6: Efecto de los iones metálicos en la actividad de la enzima, se toma como 100% la actividad enzimática correspondiente a la mezcla reactiva sin suplementar.

Metal	Concentración (mM)	% Actividad relativa
Na ⁺	1	107,07
	10	60,57
	20	37,80
K ⁺	1	107,09
	10	106,44
	20	98,26
Ca ⁺²	1	101,16
	10	121,75
	20	95,71
Zn ⁺²	1	21,74
	10	0,00
	20	0,00
Mn ⁺²	1	62,37
	10	133,02
	20	16,31
Co ⁺²	1	58,23
	10	105,88
	20	82,09
Mg ⁺²	1	116,71
	10	95,51
	20	74,86
Ni ⁺²	1	412,29
	10	108,94
	20	85,38
Cu ⁺²	1	52,29
	10	444,89
	20	30,19

Las desviaciones estándar de los resultados mostrados en todos los casos fueron inferiores al 0,1% del valor de la velocidad de catálisis. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

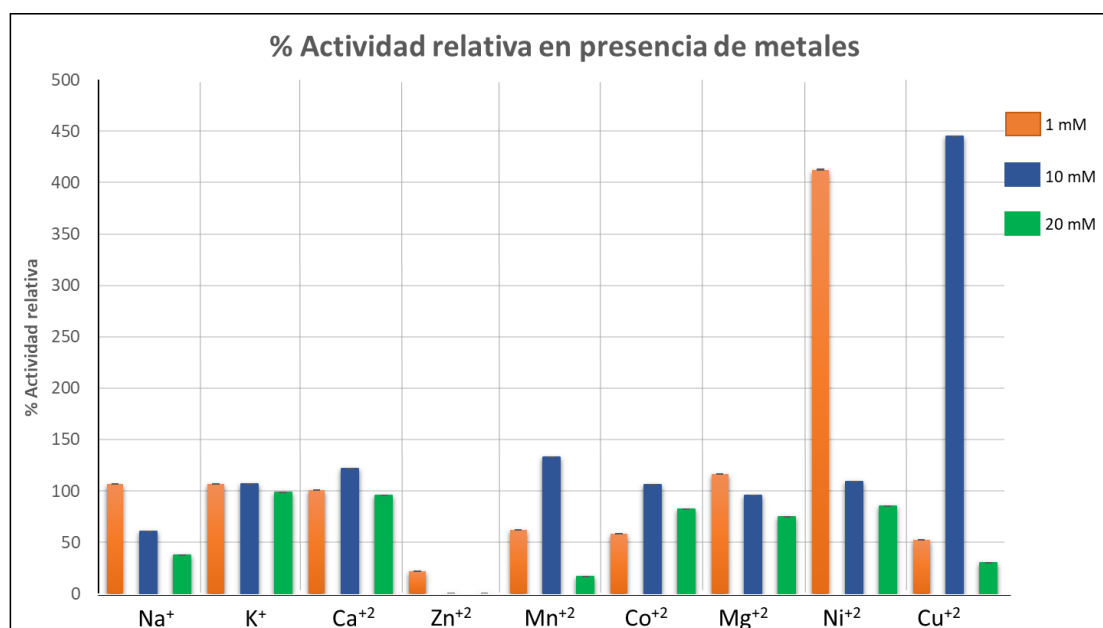


Figura 6: Representación de la actividad relativa en presencia de diferentes metales.

Observando los resultados se puede destacar la gran activación generada por la presencia de 1 mM de Ni²⁺ y de 10 mM de Cu²⁺, aumentando la actividad en un factor de 4,1 y 4,4 respectivamente, y el efecto inhibitor del Zn²⁺ en todas las concentraciones estudiadas. Este último resultado está en concordancia con lo reportado anteriormente para la lipasa BTL-2, ya que la misma posee un sitio de unión al Zn²⁺ que, al unirse con este metal, promueve la formación de dímeros que dificultan el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima, haciendo que su actividad disminuya visiblemente (28).

Estabilidad con la temperatura

Las actividades remanentes calculadas para cada temperatura se muestran en la **Tabla 7** y también se ilustran en la **Figura 7** estos resultados.

Tabla 7: Ensayo de estabilidad con la temperatura luego de 1 hora de incubación.

Temperatura (°C)	% Actividad remanente	Desviación estándar
40	102,01	0,19
50	107,92	4,12
60	51,42	1,12
65	0,72	0,27
70	0,29	0,19

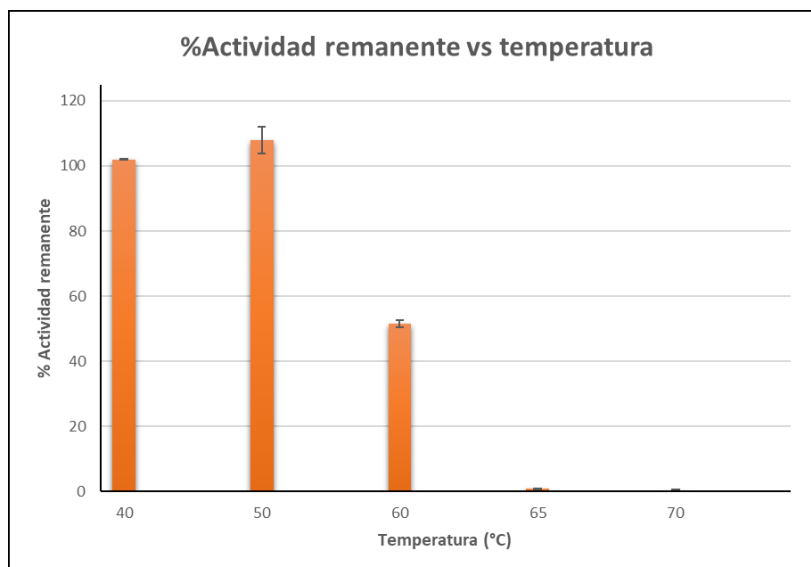


Figura 7: Ensayo de estabilidad con la temperatura de lipasa BTL-2.

Se observa que la enzima BTL-2 es 100% estable luego de 1 hora de incubación a temperaturas hasta 50 °C, y que a 60 °C mantiene un 51% de la actividad inicial. A temperaturas mayores la actividad enzimática disminuye abruptamente.

La gran estabilidad térmica que generalmente presentan las lipasas se debe a su alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos que generan una estructura compacta, evitando la desnaturalización térmica de la enzima. (29)

Estabilidad con el pH

Se realizó el estudio de estabilidad al pH, mediante la determinación de la actividad remanente tras una incubación de 1 hora y de 24 hs. Los valores de actividad remanente se muestran en la **Tabla 8** y en la **Figura 8**.

Tabla 8: Estabilidad de la enzima al pH a temperatura ambiente.

pH	Tiempo (hs)	%Actividad remanente*	Desviación estándar
4,9	1	101,40	1,80
	24	94,91	0,23
6,5	1	85,12	0,20
	24	93,85	1,72
7,0	1	90,92	1,96
	24	99,24	0,91
7,4	1	77,82	2,77
	24	53,70	2,89
8,2	1	78,74	2,96
	24	55,14	1,31
9,0	1	78,08	3,13
	24	61,30	0,32
10,0	1	85,57	1,04
	24	67,30	2,50

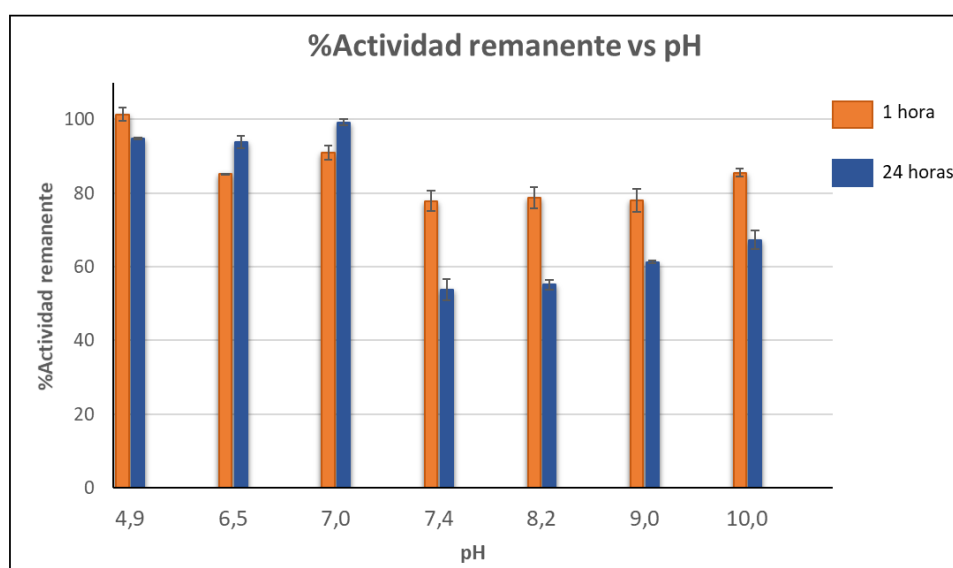


Figura 8: Ensayos de estabilidad al pH de lipasa BTL-2 luego de 1 hora de incubación y 24 hs de incubación a temperatura ambiente.

Se observa en la **Figura 8** que la enzima mantiene altos porcentajes de actividad remanente, por encima de 77%, luego de 1 h de incubación en todos los pH estudiados (pHs entre 4,9 y 10,0). Sin embargo, luego de 24 hs de incubación mantiene un porcentaje de actividad remanente por encima de 93% en un rango de pHs entre 4,9 y 7,0, disminuyendo considerablemente para los pH alcalinos estudiados.

Determinación de parámetros cinéticos

Se determinaron los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) a temperatura ambiente y pH 7,0 utilizando el sustrato artificial pNPB. Los resultados se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9: Velocidades de catálisis en función de la concentración de pNPB.

pNPB (mM)	Velocidad (mM/min)
2,00	8,34
1,75	6,25
1,50	6,76
1,25	6,52
1,00	5,70
0,75	5,50
0,50	3,29
0,25	1,37
0,13	0,49

Las desviaciones estándar de los resultados mostrados en todos los casos fueron inferiores al 0,1% del valor de la velocidad de catálisis. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

En base a estos resultados se realizó la linealización de los dobles inversos (Lineweaver-Burk) para obtener los parámetros cinéticos K_m y V_{max} :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{S} \cdot \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}}$$

Se graficó $1/v$ vs $1/[S]$, obteniendo el valor de V_{max} de la ordenada en el origen y despejando K_m de la pendiente (**Figura 9**).

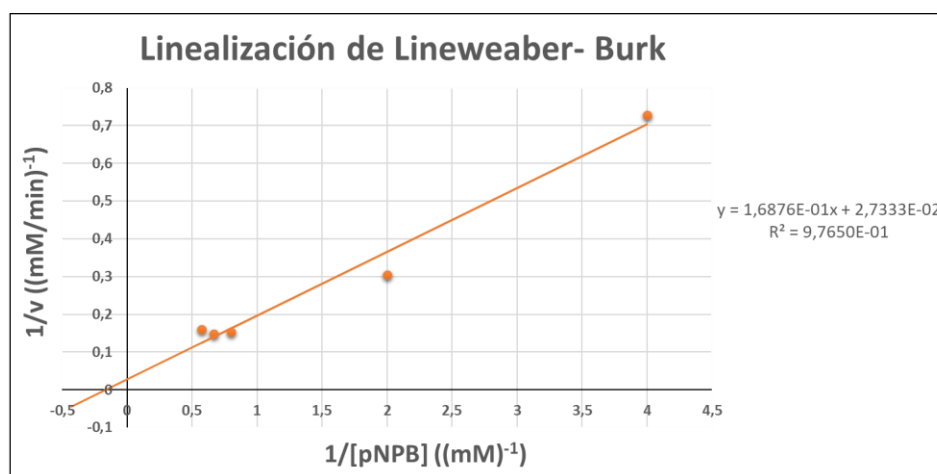


Figura 9: Gráfico de Lineweaver-Burk para obtención de parámetros cinéticos K_m y V_{max} .

Despejando de la ecuación de la recta se llegó a que la velocidad máxima de la reacción es de 36,6 mM/min, y la constante de velocidad de Michaelis-Menten (K_m) es 6,17 mM pNP, a temperatura ambiente y pH 7,0.

Estabilidad en presencia de solventes orgánicos

Se realizaron ensayos de estabilidad de la enzima en presencia de solventes orgánicos pensando en la posterior aplicación de la misma como biocatalizador de reacciones de aminólisis. Inicialmente se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica de reacciones de aminólisis catalizadas por lipasas, donde se observó que las mismas se realizaban en presencia de solventes orgánicos. Esto llevó a cuestionarnos si la lipasa de interés es estable en este medio y si podrían replicarse las condiciones de reacción reportadas con otras enzimas. Algunos de los solventes reportados en la literatura fueron 1,4-dioxano, polietilenglicol y diglyme en concentraciones 90% v/v durante 1 h de incubación. (30)

Antes de realizar los estudios de estabilidad se evaluó la miscibilidad de la enzima en los diferentes solventes como fue explicado en la sección 2.14, observándose, en todos los casos, buena miscibilidad.

Posteriormente, se realizó el ensayo de estabilidad en presencia de solventes, tomando como 100% la actividad de la enzima en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0 sin solvente. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 10**.

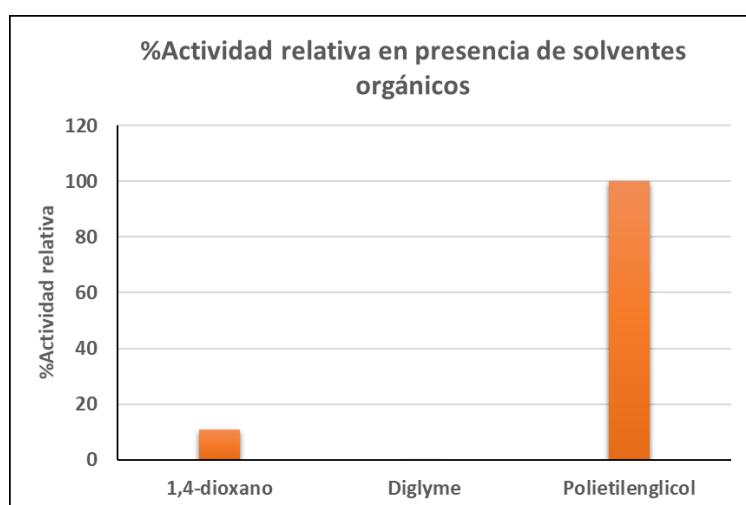


Figura 10: Estabilidad en presencia de solventes orgánicos de lipasa BTL-2. Concentración final de solventes: 90% v/v

A partir de estos ensayos observamos que BTL-2 pierde el 90% de actividad en 1,2 dioxano luego de 1 hora de incubación, respecto a la actividad obtenida en ausencia de solvente. Además, la enzima pierde completamente su actividad en diglyme luego de este tiempo. En polietilenglicol la enzima conservó el 100% de su actividad luego de 1 hora, por lo que se decidió medir la actividad remanente luego de 24 y 48 hs de incubación en este solvente para evaluar su efecto (**Figura 11**). Se observó que luego

de 24 hs BTL-2 conserva el 87% de actividad inicial, y luego de 48 hs se conserva el 48% de la actividad. Estos resultados fueron alentadores, pero, debido a que la enzima es inestable en dos de los tres solventes orgánicos testeados, se decidió realizar una nueva búsqueda bibliográfica de reacciones de aminólisis catalizadas por lipasas en mezclas de reacción sin solvente orgánico. Se encontró un reporte donde usaron la lipasa B de *Cándida antártica* (CAL-B) en ausencia de solventes orgánicos en la mezcla de reacción para llevar a cabo la reacción de aminólisis. (31)

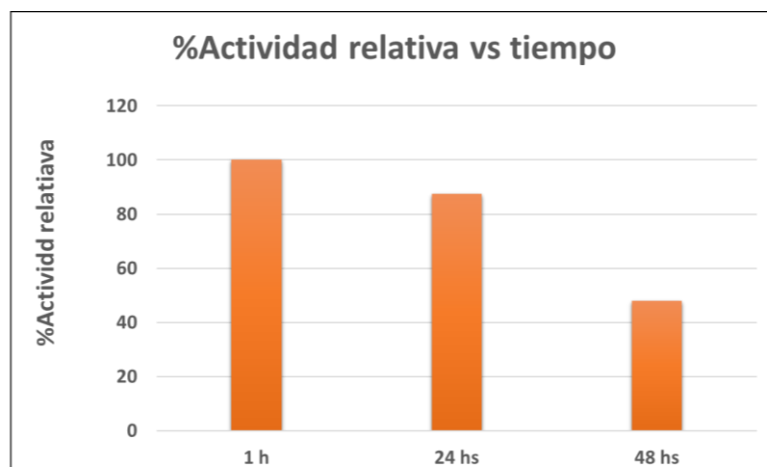


Figura 11: Estabilidad en presencia de polietilenglicol de lipasa BTL-2. Concentración final de solvente: 90% v/v

Optimización de las condiciones de cromatografía en capa fina para seguimiento de reacción de aminólisis

Para seguir el curso de las reacciones de aminólisis y de hidrólisis de las amidas respectivas, se eligió cromatografía en capa fina como método de análisis rápido. Para ello fue necesario realizar una búsqueda y optimización de las condiciones de corrida.

Inicialmente, se evaluó la fase móvil a utilizar empleando aminas y amidas modelos (α - metilbencilamina, acetato de α - metilbencilamina, 1-metil-3-fenilpropilamina y acetato de 1-metil-3-fenilpropilamina). En base a los datos reportados en la bibliografía se analizaron las siguientes fases móviles: hexano: acetato de etilo (10:1) y metanol: acetona (1:1). (32) (33) Debido a que no se lograron correr las muestras en estas condiciones, se eligió probar una fase móvil de hexano: acetona (1:1).

Paralelamente, se probaron diferentes reveladores para aminas y amidas. Entre los reveladores evaluados encontramos: ninhidrina, ácido sulfúrico 50%, revelador de hidroxilamina, ácido fosfomolibdico, permanganato de potasio, Brady, y lámpara UV. En

la **Figura 12** se muestran los reveladores que funcionaron para revelar la amina, la amida y la mezcla de ambos compuestos. Los resultados mostrados corresponden a la amina modelo α -metilbencilamina y a acetato de α -metilbencilamina, pero se obtuvieron los mismos resultados con la otra amina modelo y su correspondiente amida.

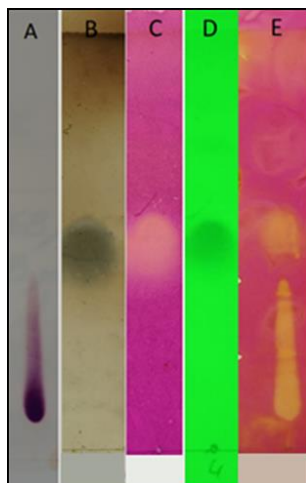


Figura 12: Reveladores evaluados para aminas y amidas (fase móvil hexano:acetona 1:1). **A:** α -metilbencilamina revelada con ninhidrina, **B:** acetato de α -metilbencilamina revelado con Brady, **C:** acetato de α -metilbencilamina revelado con permanganato de potasio, **D:** acetato de α -metilbencilamina bajo lámpara UV, **E:** mezcla de α -metilbencilamina y acetato de α -metilbencilamina revelada en permanganato de potasio

En base a estos ensayos concluimos que la fase móvil más adecuada para resolver la mezcla de la amina y amida correspondiente, es la mezcla de hexano y acetona (1:1), sembrando en espejo y revelando con ninhidrina para visualizar las aminas y permanganato de potasio para lograr ver las aminas y las amidas.

Síntesis de amidas (aminólisis) empleando enzima modelo

Como ya fue mencionado Pääviö et al. (2012), reportaron el uso de la lipasa de *Candida antarctica B* (CAL-B) para la reacción de aminólisis en sistemas libre de solventes orgánicos tanto a temperatura ambiente como a 47 °C, con tiempos de reacciones de 24 hs (26). Por lo tanto, se decidió reproducir la reacción en las condiciones reportadas en bibliografía con los recursos disponibles en nuestro laboratorio.

Siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.5.1 de materiales y métodos se determinó que la preparación comercial de la lipasa CAL-B presenta 4,3 UE/mg y en base a este resultado y siguiendo el método descrito por Pääviö et al. (2012) se utilizaron 107,4 UE/ mL de mezcla de reacción (ver sección 2.15 de materiales y métodos).

La evaluación de la reacción se hizo por TLC, en las condiciones optimizadas previamente (mezcla de hexano y acetona (1:1) como fase móvil, revelando con ninhidrina y permanganato de potasio). Los resultados de la reacción de aminólisis con 1-metil-3-fenilpropilamina se muestran en la **Figura 13**. Los resultados mostrados corresponden a la aminólisis realizada a temperatura ambiente, pero son representativos de la reacción a ambas temperaturas.

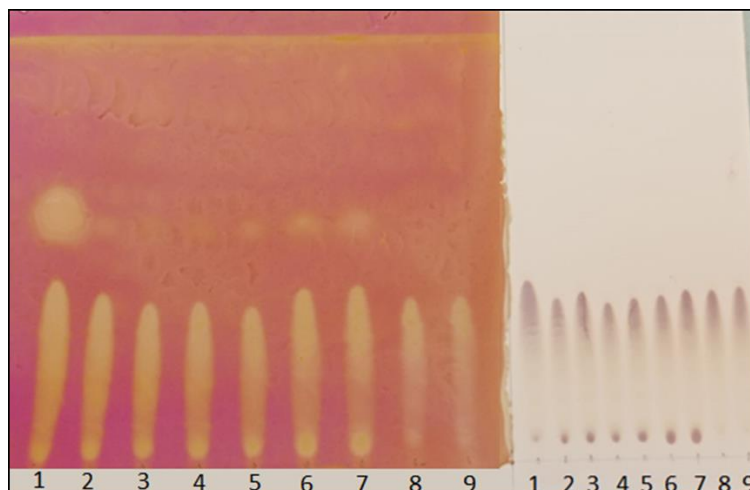


Figura 13: TLC del avance de la reacción de aminólisis usando lipasa CAL-B y 1-metil-3-fenilpropilamina y acetato de etilo como sustratos, revelado con permanganato de potasio (izquierda) y ninhidrina (derecha). 1: Control de resolución (1-metil-3-fenilpropilamina 120mM + acetato de 1-metil-3-fenilpropilamina 174 mM), 2: Muestra luego de 0,5 hs de reacción, 3: Muestra luego de 1 h de reacción, 4: Muestra luego de 1,5 hs de reacción, 5: Muestra luego de 3 hs de reacción, 6: Muestra luego de 24 hs de reacción, 7: muestra de síntesis luego de 48 hs, 8: Control negativo luego de 24 hs de reacción, 9: Control negativo luego de 48 hs de reacción.

Podemos concluir que la síntesis de acetato de 1-metil-3-fenilpropilamina mediante reacción de aminólisis fue exitosa porque en la **Figura 12** se observan manchas desde el carril 2 al 7 con igual Rf que el acetato de 1-metil-3-fenilpropilamina presente en el control de resolución del carril 1, y dicha mancha no se encuentra presente en ninguno de los dos controles negativos de reacción (carriles 8 y 9). Además, se observa que la mancha correspondiente a la amida va aumentando su intensidad a medida que transcurre la reacción de síntesis.

Al realizar la reacción de aminólisis usando α -metilbencilamina como sustrato no se observó síntesis de la amida de interés, tanto a temperatura ambiente como a 47 °C.

Hidrólisis de amidas empleando enzima modelo

Por su parte, la hidrólisis de las amidas mostró resultados favorables al emplear acetato de 1-metil-3-fenilpropilamina y acetato de α -metilbencilamina. En la **Figura 14** se muestra el avance de la reacción de hidrólisis para acetato de 1-metil-3-fenilpropilamina catalizado por la lipasa CAL-B. A las 24 h de reacción (carril 2) no se observa hidrólisis (ausencia de mancha correspondiente a la amina); sin embargo, a las 48 hs de reacción se observa una nueva mancha que se encuentran en el punto de siembra del carril 3, que se revela tanto con permanganato de potasio como con ninhidrina. Llama la atención que el Rf de la mancha correspondiente a la amina en el control positivo (carril 1) no concuerda con el Rf de esta nueva mancha en el carril 3. Sin embargo, el hecho de que revele con ninhidrina que es un revelador específico para aminas, hace pensar que se trata de la amina liberada por la hidrólisis. Los resultados mostrados corresponden a la hidrólisis de amidas usando acetato de 1-metil-3-fenilpropilamina como sustrato, pero son también representativos de los resultados obtenidos de la hidrólisis con α -metilbencilamina.

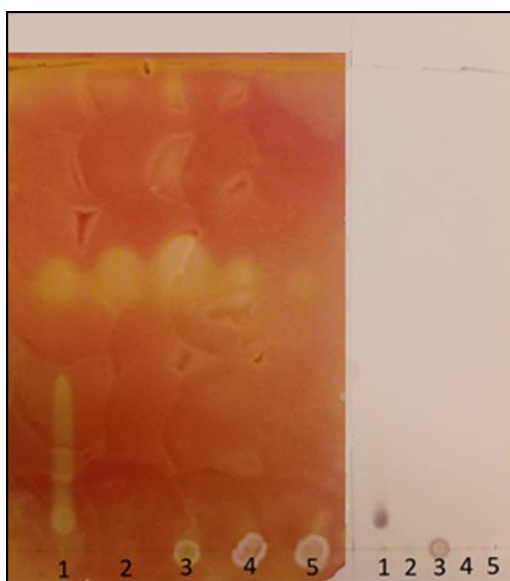


Figura 14: TLC del avance de la reacción de hidrólisis de acetato de 1-metil-3-fenilpropilamina usando lipasa CAL-B, revelado con permanganato de potasio (izquierda) y ninhidrina (derecha). 1: Control de resolución (1-metil-fenilpropilamina 120 mM + acetato de 1-metil-3-fenilpropilamina 174 mM), 2: Muestra luego de 24 hs de reacción, 3: Muestra luego de 48 hs de reacción, 4: Control negativo de hidrólisis luego de 24 hs de reacción, 5: control negativo luego de 48 hs de reacción.

En base a estos resultados se concluyó que la hidrólisis funcionó. Una posibilidad es que las aminas producidas durante la hidrólisis se encuentren protonadas, ya que durante la reacción de hidrólisis también se libera ácido acético que podría cambiar el pH final de la mezcla de reacción; la protonación de la amina podría ser la causa de que

no se desplacen más allá del punto de siembra. Con el fin de comprobar nuestra hipótesis, se realizó la preparación de las aminos en concentración 120 mM en una mezcla de hexano y buffer citrato 0,5 M pH 2,36 (1:1), y se centrifugaron para lograr la interacción entre la fase acuosa y orgánica. Posteriormente, se realizó una TLC con la fase móvil de hexano y acetona (1:1) usando como revelador ninhidrina, en la cual se sembraron 1-metil-3-fenilpropilamina y α -metilbencilamina 120 mM preparadas en hexano y las muestras mencionadas anteriormente. Los resultados se ilustran en la **Figura 15**.



Figura 15: TLC de muestras de α -metilbencilamina y 1-metil-3-fenilpropilamina revelado con ninhidrina. 1: α -metilbencilamina 120 mM en hexano, 2: α -metilbencilamina 120 mM en mezcla de hexano y buffer citrato 0,5 M pH 2,36, 3: 1-metil-3-fenilpropilamina 120mM en hexano, 4: 1-metil-3-fenilpropilamina 120 mM en mezcla de hexano y buffer citrato 0,5 M pH 2,36.

Se observa que las aminos preparadas en la mezcla de hexano y buffer citrato 0,5 M pH 2,3 quedan en el punto de siembra, al igual que ocurre con las aminos generadas a partir de la reacción de hidrólisis de amidas con CAL-B, y a diferencia de las aminos preparadas en hexano. Por lo tanto, podemos concluir que las aminos producidas mediante esta reacción se encuentran protonadas y éste es el motivo por el cual no corren en la TCL a pesar de estar en una fase móvil adecuada.

En base a estos resultados se concluyó que se logró la hidrólisis de las amidas modelos utilizando la lipasa CAL-B.

Síntesis de amidas (aminólisis) empleando BTL-2

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con CAL-B, se procedió a la síntesis de acetato de 1-metil-3-fenilpropilamina usando la lipasa BTL-2.

La lipasa BTL-2 obtenida mediante múltiples procesos de purificación fue liofilizada con el fin de usarla en la reacción en estado sólido como CAL-B. La liofilización dio como resultado un preparado enzimático de textura viscosa, imposibilitando su pesado. Por este motivo se decidió disolver la enzima en agua destilada para su posterior aplicación, con lo cual se logró usar un volumen 5 veces menor al inicial, logrando concentrar la muestra.

Con el fin de incubar, en caso de ser posible, las mismas unidades de enzima que se utilizaron con la lipasa CAL-B en la mezcla de reacción se realizó la medida de actividad de este preparado de la enzima BTL-2 según fue descrito en la sección 2.5 de materiales y métodos, dando 315,35 UE/mL. Según estos resultados para mantener las mismas unidades de enzima se deberían añadir 179 μ L de lipasa BTL-2 en la mezcla de reacción. Esto supone el agregado de 25,4% de agua a la mezcla, lo que favorecería la reacción de hidrólisis de las amidas generadas en la síntesis. Por este motivo, se decidió emplear 27,75 μ L de enzima BTL-2 (15,8 UE/mL de mezcla de reacción) que corresponde a un 5% de agua en la mezcla de reacción.

Considerando que en la reacción participa el acetato de etilo, se decidió evaluar la actividad de la enzima en presencia de este compuesto, usando las cantidades propuestas de cada uno para la mezcla de reacción. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 10**.

Tabla 10: Ensayo de actividad de lipasa BTL-2 en presencia de acetato de etilo. *Respecto a la actividad usando como control 195 μ L buffer fosfato de sodio 25mM pH 7,0 + 27,75 μ L BTL-2

Muestra	%Actividad relativa*
195 μ L acetato de etilo + 27,75 μ L BTL-2	101,5

Las desviaciones estándar de los resultados mostrados en todos los casos fueron inferiores al 0,1% del valor de la velocidad de catálisis. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

A partir de este ensayo se concluye que la enzima mantiene el 100% de su actividad en estas condiciones. Además, como la reacción de síntesis se realiza durante 24 hs a 47 °C, se realizó un ensayo de estabilidad de la enzima en estas condiciones, observándose que la misma es estable durante 24 hs a esta temperatura conservando un 95% de actividad (**Tabla 11**).

Tabla 11: Ensayo de estabilidad de lipasa BTL-2 a 47 °C.

Tiempo (hs)	%Actividad remanente
1	102,0
24	95,2

Las desviaciones estándar de los resultados mostrados en todos los casos fueron inferiores al 0,1% del valor de la velocidad de catálisis. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Teniendo en cuenta que la enzima mantiene su actividad en presencia de acetato de etilo y a una temperatura de 47 °C por al menos 24 hs, se procedió a realizar la reacción de síntesis de acetato de 1-metil-3-fenilpropilamina, según lo descrito en la sección 2.15 de materiales y métodos.

La reacción se realizó como fue descrito, usando 27,75 µL de BTL-2 conteniendo 8,74 UE en lugar de 56,4 UE de CAL-B. Se siguió el avance de la reacción por TLC, al realizar el revelado, no se observó síntesis de la amida de interés a ninguno de los tiempos de reacción (24,48 y 72 hs). Esto puede deberse a varias causas, una es que la cantidad de UE utilizadas en el caso de la lipasa BTL-2 es 6,7 veces menor que en el caso de la lipasa CAL-B, no siendo suficiente para ver avance en la reacción en las condiciones utilizadas. También puede deberse a que la enzima no es estable a esa temperatura de reacción luego de las 24h, para corroborarlo se debería realizar un ensayo de estabilidad a esa temperatura hasta las 72 hs.

En base a esto, se realizó la reacción a temperatura ambiente, pero tampoco se observó síntesis de acetato de 1-metil-3-fenilpropilamina en esta nueva condición. La TLC realizada que muestra este resultado se ilustra en la **Figura 16** y es representativa de la reacción de síntesis a ambas temperaturas.

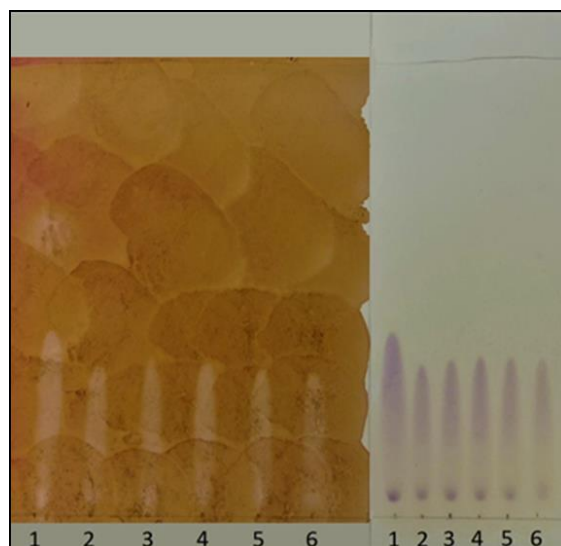


Figura 16: TLC de avance de la reacción de aminólisis usando lipasa BTL-2 y 1-metil-3-fenilpropilamina y acetato de etilo como sustratos, revelado con permanganato de potasio (izquierda) y ninhidrina (derecha). 1: Control de resolución (1-metil-fenilpropilamina 120 mM + acetato de 1-metil-3-fenilpropilamina 174 mM), 2: Muestra luego de 24 hs de reacción, 3: Muestra luego de 48 hs de reacción, 4: Muestra luego de 72 hs de reacción, 5: Muestra luego de 96 hs de reacción, 6: Control negativo luego de 96 hs de reacción.

También puede ocurrir que la 1-metil-3-fenilpropilamina no sea un sustrato adecuado para esta enzima, aunque si lo sea para la lipasa CAL-B, y viceversa, que la α -metilbencilamina si sea un buen sustrato para la lipasa BTL-2 y no para la CAL-B, considerando que la especificidad de sustrato de cada enzima es diferente dependiendo de las características bioquímicas de cada una de ellas.

Por este motivo se procedió a realizar la reacción usando como sustrato α -metilbencilamina. La reacción se realizó como fue descrito en la sección 2.15.1 de materiales y métodos usando 27,75 μ L de BTL-2 conteniendo 8,74 UE en lugar de 56,4 UE de CAL-B. La mezcla de reacción se incubó paralelamente a temperatura ambiente y a 47 °C. La TLC realizada con las muestras de síntesis obtenidas de la mezcla de reacción incubada a temperatura ambiente se muestra en la **Figura 17**.

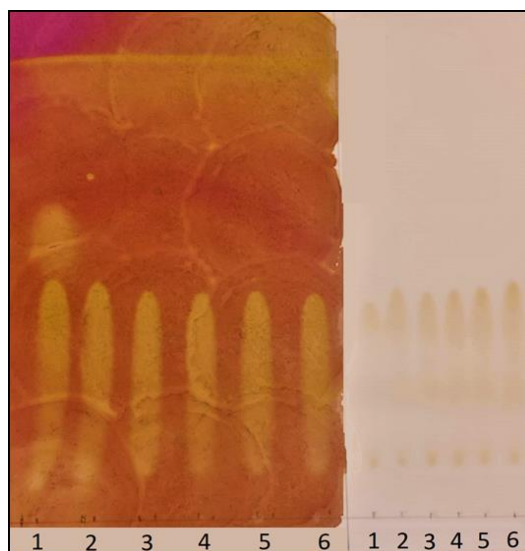


Figura 17: TLC del avance de la reacción de aminólisis usando lipasa BTL-2 y α -metilbencilamina y acetato de etilo como sustratos, revelado con permanganato de potasio (izquierda) y ninhidrina (derecha). 1: Control de resolución (α -metilbencilamina 120 mM + acetato de α -metilbencilamina 200 mM), 2: Muestra luego de 24 hs de reacción, 3: Muestra luego de 48 hs de reacción, 5: Muestra luego de 96 hs de reacción, 6: Control negativo luego de 96 hs de reacción.

Tanto a temperatura ambiente como a 47 °C se observó el mismo patrón en la cromatografía. Esto indica que no hubo síntesis de la amida de interés (acetato de α -metilbencilamina) en ninguna de las dos condiciones de reacción ya que no se observa la mancha correspondiente a la amida al revelar con permanganato de potasio que sí aparece en el control de resolución. Por esto se concluyó que las aminas modelos utilizadas no son un buen sustrato para la reacción de aminólisis catalizada por la lipasa BTL-2 en las condiciones de reacción descritas.

Hidrólisis de amidas empleando lipasa BTL-2

Se realizó la reacción de hidrólisis de ambas amidas modelos usando la lipasa BTL-2 como se describe en la sección 2.16 y 2.16.1 de materiales y métodos, usando acetato de α -metilbencilamina y acetato de 1-metil-3-fenilpropilamina como sustrato. Debido a que la lipasa de *Geobacillus thermocatenulatus* no es estable a 70 °C como fue visto en los resultados de estabilidad a la temperatura discutidos anteriormente, se decidió llevar a cabo la reacción a 40 °C. Las TLC obtenidas al analizar las muestras de hidrólisis tomadas a diferentes tiempos se muestran en la **Figura 18** y **Figura 19**.

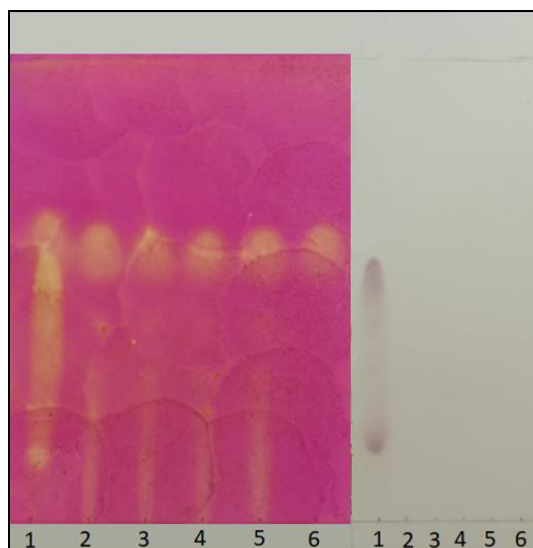


Figura 18: TLC del avance de la reacción de hidrólisis de acetato de α -metilbencilamina usando lipasa BTL-2, revelado con permanganato de potasio (izquierda) y ninhidrina (derecha). 1: Control de resolución (α -metilbencilamina 120 mM + acetato de α -metilbencilamina 200 mM), 2: Muestra luego de 24 hs de reacción, 3: Muestra luego de 48 hs de reacción, 4: Muestra luego de 72 hs de reacción, 5: Muestra luego de 96 hs de reacción, 6: Control negativo luego de 96 hs de reacción.

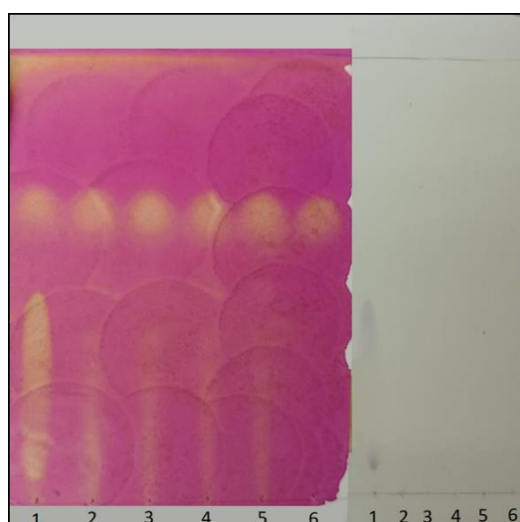


Figura 19: TLC del avance de la reacción de hidrólisis de acetato de 1-metil-3-fenilpropilamina usando lipasa BTL-2, revelado con permanganato de potasio (izquierda) y ninhidrina (derecha). 1: Control de resolución (1-metil-3-fenilpropilamina 120 mM + acetato de 1-metil-3-fenilpropilamina 174 mM), 2: Muestra luego de 24 hs de reacción, 3: Muestra luego de 48 hs de reacción, 4: Muestra luego de 72 hs de reacción, 5: Muestra luego de 96 hs de reacción, 6: Control negativo luego de 96 hs de reacción.

Como se observa en las imágenes, en la hidrólisis de ambas amidas se obtiene un producto de reacción con un R_f levemente menor al de la amina presente en el control positivo pero que puede corresponder a ésta. Además, al mirar el control negativo luego de 96 hs no se observa esta mancha, lo que nos permite descartar la idea de que la misma corresponda a un producto de degradación de uno de los reactivos.

Al comparar la intensidad de los productos de reacción con el control de resolución se observa que en las muestras la intensidad es menor, lo que puede explicarse por el hecho de que la concentración de las aminas generadas es baja. Este hecho puede explicar que estas manchas no se revelen con ninhidrina, a pesar de que es un revelador específico de aminas, debido a que posiblemente se esté por debajo de su límite de detección.

En relación a la diferencia entre este resultado y el obtenido con la lipasa de CAL-B (donde la amina liberada durante la hidrólisis se veía en la siembra de la TLC), es el hecho de que la lipasa BTL-2 antes de ser liofilizada se encontraba en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0, y al retomarse el liofilizado en agua el pH 7,0 del buffer se mantiene, pero la fuerza iónica del mismo fue aumentada cinco veces. Este buffer de mayor fuerza iónica presente en la enzima en solución es capaz de amortiguar la acidificación del medio por la liberación del grupo acetato en la reacción de hidrólisis de la amida, evitando la protonación de las aminas generadas y permitiendo que corran en la TLC de manera muy similar a como lo hace la amina en el control de resolución. Además, el hecho de que el avance de la reacción de hidrólisis sea muy poco hace que la cantidad de acetato liberado sea menor y por ende afecta menos el pH del medio de reacción.

Conclusiones

En el presente trabajo se logró expresar la esterasa I de *Pseudomonas fluorescens* en una cepa de *E. coli* BL21 DE3, la misma se dio bajo la forma de cuerpos de inclusión.

Se logró producir y purificar la lipasa de *Geobacillus thermocatenulatus* BTL-2. Se realizó su caracterización bioquímica y se determinó que se trata de una lipasa alcalina e hipertermofílica, capaz de activarse en presencia de Tritón X-100 al 0,02 %, Ni^{+2} 1 mM y Cu^{+2} 10 mM. La lipasa estudiada es estable a temperaturas menores o iguales a 50 °C y a valores de pH entre 5 y 10 luego de 1 hora de incubación. Demostró ser estable en presencia de polietilenglicol, un solvente orgánico presente en algunas reacciones de aminólisis catalizadas por lipasas, y presenta actividad en presencia de acetato de etilo, sustrato utilizado en las reacciones de aminólisis. Estas características en conjunto hacen de la lipasa de *Geobacillus thermocatenulatus* un catalizador muy versátil, capaz de soportar diferentes condiciones de reacción y permitiendo su uso en múltiples áreas.

Se logró optimizar las condiciones de la cromatografía en capa fina para resolver las aminas modelos y sus amidas correspondientes, y de esa manera poder seguir el avance de la reacción tanto de síntesis como de hidrólisis de las amidas.

Se optimizaron las condiciones de reacción para la síntesis de amida mediante aminólisis e hidrólisis de la amida utilizando una enzima modelo comercial: la lipasa CAL-B. Dichas condiciones de reacción optimizadas fueron utilizadas para llevar a cabo las mismas reacciones utilizando la lipasa BTL-2 como biocatalizador.

Se logró llevar a cabo la hidrólisis de acetato de 1-metil-3-fenilpropilamina y acetato de α -metilbencilamina usando la lipasa BTL-2, aunque con avances de reacción mucho menores que los observados para la enzima comercial. Respecto a la reacción de aminólisis en las condiciones estudiadas y utilizando las dos aminas modelos seleccionadas no se observó formación de las amidas correspondientes.

Perspectivas

Dado que se logró una buena expresión heteróloga de la esterasa I de *Pseudomonas fluorescens* en la fracción insoluble celular se propone como una de las perspectivas de este trabajo estudiar estrategias de purificación de la misma de los cuerpos de inclusión. Si esto se puede lograr se procederá a realizar su caracterización bioquímica y posteriormente su aplicación a reacciones de aminólisis y de hidrólisis de las aminas modelos.

Se propone también realizar la hidrólisis de amidas con CAL-B aumentando la fuerza iónica del buffer en la mezcla de reacción para amortiguar la acidificación de la mezcla y la protonación de las aminas generadas.

Se plantea la inmovilización de la lipasa de *Geobacillus thermocatenulatus* para su posterior uso en estado sólido en las reacciones planteadas en este trabajo. Esto permitiría su reuso en múltiples ciclos de reacción, disminuyendo los costos de producción y purificación.

Debería además evaluarse si la aminólisis de las aminas modelos es posible al realizarla en otras condiciones de concentración de la enzima y del sustrato utilizado como donante del grupo acilo.

Además, se propone la evaluación de los productos de reacción de hidrólisis y aminólisis obtenidos con las lipasas CAL-B y BTL-2 por cromatografía de gases (GC) para confirmar su naturaleza, donde se analizaría la pureza enantiomérica de los productos obtenidos en cada caso y se realizaría su cuantificación.

En caso de confirmar que los productos sintetizados corresponden a las amidas de interés y que la lipasa BTL-2 es enantioselectiva, se propone aplicar esta lipasa a la resolución de la mezcla racémica de la anfetamina involucrada en la síntesis del L-deuterodeprenil.

Referencias

- (1) C.K. Mathews, K.E. Van Holde y K.G. Ahern (2002) *Bioquímica*. 3ª Edición. Pearson Educación.
- (2) Sheldon, R. A., & Woodley, J. M. (2018). Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chemical Reviews*, 118(2), 801–838. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00203>
- (3) Luna, H. (2004). Aplicación de la biocatálisis a la preparación de intermediarios para la síntesis de fármacos. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 48(3), 211–219.
- (4) Ferrer, M., Bargiela, R., Martínez-Martínez, M., Mir, J., Koch, R., Golyshina, O. V., & Golyshin, P. N. (2015). Biodiversity for biocatalysis: A review of the α/β -hydrolase fold superfamily of esterases-lipases discovered in metagenomes. *Biocatalysis and Biotransformation*, 33(5–6), 235–249. <https://doi.org/10.3109/10242422.2016.1151416>
- (5) Boland, W. (1991). Esterolytic and Lipolytic Enzymes in Organic Synthesis. *Institut Fur Organische Chemie Der Universitat Karlsruhe*, 1049–1072. <https://doi.org/10.3109/10242422.2016.1151416>
- (6) Kapoor, M., & Gupta, M. N. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, 47(4), 555–569. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.011>
- (7) Nardini, M., & Dijkstra, B. W. (1999). α/β hydrolase fold enzymes: The family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(6), 732–737. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)00037-8](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)00037-8)
- (8) Kazlauskas, R.J., Bornscheuer, U.T., 2008. Biotransformations with Lipases. *Biotechnol. Second. Complet. Revis. Ed.* 8–12, 37–191.
- (9) Muralidhar, R. V., Chirumamilla, R. R., Marchant, R., Ramachandran, V. N., Ward, O. P., & Nigam, P. (2002). Understanding lipase stereoselectivity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(2), 81–97. <http://doi.org/10.1023/A:1014417223956>
- (10) Casas-Godoy, L., Duquesne, S., & Bordes, F. (2012). Lipases and Phospholipases. *Methods Mol Biol*, 861, 3–30. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5>
- (11) Moura, M., de Andrade, R.A., Dobler, L., de Godoy, K., Cohelo, G., Dinis, C., Volcan, R. (2017). Extremophilic Lipases. En R.K. Sani, R.N. Krishnaraj (Eds.), *Extremophilic Enzymatic Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Bioenergy*, (249-270). Springer

- (12) Casas-Godoy, L., Gasteazoro, F., Duquesne, S., Bordes, F., Marty, A., Sandoval, G. (2018). Lipases: An Overview: Methods and Protocols. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_1
- (13) Guerrand, D. (2017). Lipases industrial applications: Focus on food and agroindustries. *OCL - Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 24(4). <https://doi.org/10.1051/ocl/2017031>
- (14) Jaeger K-E, Reetz MT: Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* 1998, 16:396-403.
- (15) Jaeger, K. E., & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 390–397. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00341-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00341-5)
- (16) Nguyen, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2006). Chiral drugs: an overview. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 2(2), 85–100.
- (17) Patel, R. N. (2008). Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Coordination Chemistry Reviews*, 252(5–7), 659–701. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.10.031>
- (18) Avenue, M. (2001). *Industrial biocatalysis Aleksey Zaks*. 130–136.
- (19) Merck, E. (1980). Dyeing Reagents for Thin-Layer and Paper Chromatography. In *Amines Amino acids Amino acids*. <http://www.cchem.berkeley.edu/rsgrp/TLCStainGeneralReference.pdf>
- (20) Khalameyzer, V., Fischer, I., Bornscheuer, U. T., & Altenbuchner, J. (1999). Screening, nucleotide sequence, and biochemical characterization of an esterase from *Pseudomonas fluorescens* with high activity towards lactones. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 477–482. <https://doi.org/10.1128/aem.65.2.477-482.1999>
- (21) Luisa Rúa, M., Schmidt-Dannert, C., Wahl, S., Sprauer, A., & Schmid, R. D. (1997). Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*. *Journal of Biotechnology*, 56(2), 89–102. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(97\)00079-5](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(97)00079-5)
- (22) Maria Teresa Neves Petersen, Peter Fojan, Steffen B Petersen, How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution, *Journal of Biotechnology*, Volume 85, Issue 2, 2001, Pages 115-147. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00360-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00360-6)
- (23) Castilla A., Rodriguez Goirdano S., Irazoqui G. Extremophilic lipases and esterases: Characteristics and industrial applications. In: *Microbial Extremozymes Novel Sources and Industrial Applications*, 1st Edition, Kuddus M (Ed) Paperback ISBN: 9780128229453,

- (24) Luisa Rúa, M., Schmidt-Dannert, C., Wahl, S., Sprauer, A., & Schmid, R. D. (1997). Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. *Journal of Biotechnology*, 56(2), 89–102. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(97\)00079-5](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(97)00079-5)
- (25) Schmidt-Dannert, C., Rúa, M. L., Atomi, H., & Schmid, R. D. (1996). Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, 1301(1–2), 105–114. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(96\)00027-6](https://doi.org/10.1016/0005-2760(96)00027-6)
- (26) Sukohidayat, N. H. E., Zarei, M., Baharin, B. S., & Manap, M. Y. (2018). Purification and characterization of lipase produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293 using an aqueous two-phase system (ATPS) composed of triton x-100 and maltitol. *Molecules*, 23(7). <https://doi.org/10.3390/molecules23071800>
- (27) Panizza, P., Syfantou, N., Pastor, F. I. J., Rodríguez, S., & Díaz, P. (2013). Acidic lipase Lip I.3 from a *Pseudomonas fluorescens*-like strain displays unusual properties and shows activity on secondary alcohols. *Journal of Applied Microbiology*, 114(3), 722–732. <https://doi.org/10.1111/jam.12089>
- (28) Timucin, E., & Sezerman, O. U. (2015). Zinc Modulates Self-Assembly of *Bacillus thermocatenulatus* Lipase. *Biochemistry*, 54(25), 3901–3910. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00200>
- (29) Yadira F-J, Amparo I. Z, Luis A-P. Caracterización parcial de una lipasa extracelular de *Marinobacter* sp. empleando la metodología de superficie respuesta. *Ciencia e investigación* [Internet]. 17 de junio de 2013 [citado 18 de agosto de 2021];16(1):12-7. Disponible en: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/8630>
- (30) Manova, D., Gallier, F., Tak-Tak, L., Yotava, L., & Lubin-Germain, N. (2018). Lipase-catalyzed amidation of carboxylic acid and amines. *Tetrahedron Letters*, 59(21), 2086–2090. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.04.049>
- (31) Päiviö, M., Perkiö, P., & Kanerva, L. T. (2012). Solvent-free kinetic resolution of primary amines catalyzed by *Candida antarctica* lipase B: Effect of immobilization and recycling stability. *Tetrahedron Asymmetry*, 23(3–4), 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2012.02.008>
- (32) Zoete, M. C. De, Dalen, A. C. K., Rantwijk, F. Van, & Sheldon, R. A. (1996). *i A new enzymatic one-pot procedure for the synthesis of carboxylic amides from carboxylic acids. 2,*

19–25.

(33) Words, K. (1980). Separation of Aliphatic and Aromatic Amines by Thin-Layer Chromatography Using Silica Gel Plates. *Xx*, 623–625.

Anexo

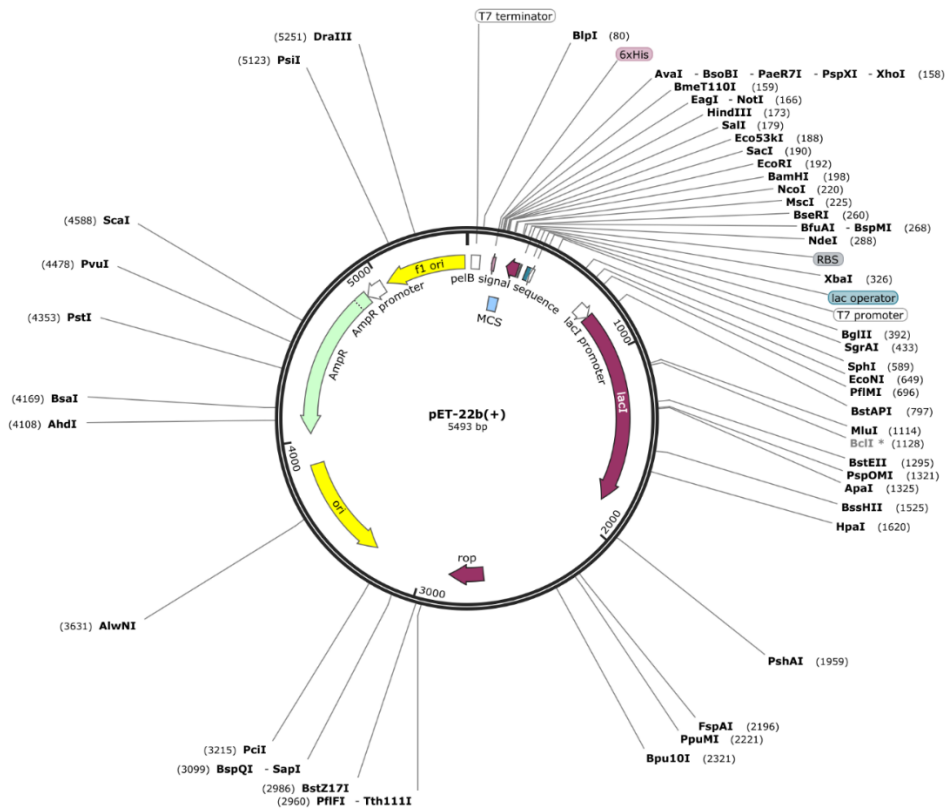


Figura 1: Vector pET-22b. Extraído de SnapGene.

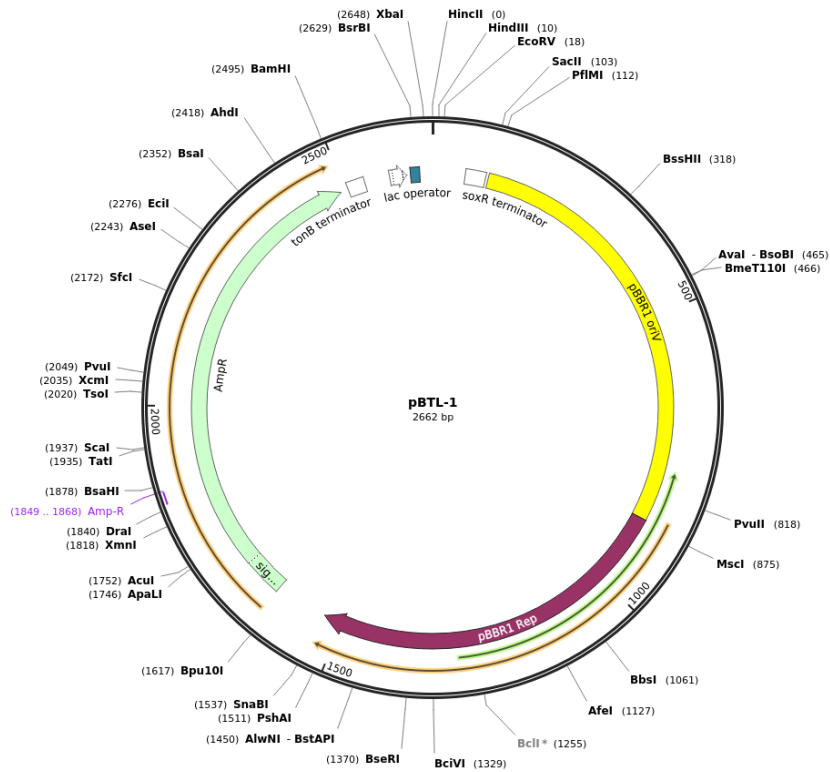


Figura 2: Vector pBTL1. Extraído de SnapGene.

Apéndice

Tabla 1: Tabla de purificación de lipasa BTL-2 de *Geobacillus thermocatenulatus* *medido a $\lambda=348$ nm. ** $\epsilon=5.58 \times 10^{-3} \mu M^{-1}$. Los valores expresados en la tabla corresponden a un proceso de purificación pero son representativos de todos los procesos de purificación realizados, al menos 10 veces.

Fracción	Volumen (mL)	Pendiente*	Factor de dilución	UE/mL**	UE totales	%Recuperación
Fracción soluble	5,50	0,81	10	73,84	406,17	100,00
Percolado octil-agarosa	5,50	0,07	2	1,25	6,86	1,69
L1 octil-agarosa	5,50	0,04	2	0,72	3,97	0,98
L2 octil-agarosa	5,50	0,03	2	0,59	3,28	0,81
Eluido octil-agarosa	2,75	0,96	10	87,74	241,29	59,41
Percolado DEAE-Sepharose	2,75	0,72	10	65,53	180,21	44,37
L1 DEAE-Sepharose	2,75	1,74	1	15,93	43,81	10,79
L2 DEAE-Sepharose	2,75	0,59	1	5,43	14,93	3,68
L3 DEAE-Sepharose	2,75	0,46	1	4,21	11,57	2,85
Eluido DEAE-Sepharose	2,75	0,04	2	0,80	2,21	0,54