



# **PRODUCCIÓN, CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA E INMOVILIZACIÓN DE LIPASAS MICROBIANAS Y SUS APLICACIONES**

**Tesis**

**Doctorado en Química**

**B.C. Agustín Castilla Arboleya**

**Orientadoras**

**Dra. Gabriela Irazoqui**

Área Bioquímica, Facultad de Química

**Dra. Sonia Rodríguez**

Área Microbiología, Facultad de Química







**PRODUCCIÓN, CARACTERIZACIÓN  
BIOQUÍMICA E INMOVILIZACIÓN DE LIPASAS  
MICROBIANAS Y SUS APLICACIONES**

**B.C. Agustín Castilla Arboleya**

**Trabajo presentado para obtener el título de  
Doctor en Química**

**Orientadoras**

**Dra. Gabriela Irazoqui**

Área Bioquímica, Facultad de Química

**Dra. Sonia Rodríguez**

Área Microbiología, Facultad de Química

**Tribunal evaluador**

**Dra. Giana Cecchetto**

**Dra. Valeria Schapiro**

**Dr. Fernando López Gallego**





**“Someone’s sitting in the shade  
today because someone planted a  
tree a long time ago”**



## Agradecimientos

Este trabajo es el resultado de muchos años de esfuerzo y aprendizaje, que responden a mi forma de ser curioso e inquieto. Todo el proceso hubiese sido más complejo sin el apoyo de las agencias que lo financiaron y me permitieron llevarlo a cabo con cierta tranquilidad, por lo que quiero agradecerles a la ANII, CSIC, CAP, AECID por el aporte económico que realizaron. Además, quiero agradecer a las personas, laboratorios e instituciones que me recibieron, al Área Farmacología que nos permitió utilizar el fluorímetro, al laboratorio de Alimentos del ITP que me permitió utilizar el GC, al Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Barcelona donde fui recibido por el Dr. Francisco Valero, la Universidad de Zaragoza donde fui recibido por la Dra. Valeria Grazú y el Dr. Fernando López Gallego. Sobre todo, darle las gracias a la Facultad de Química, al PEDECIBA Química, y a las Áreas Bioquímica y Microbiología que me abrieron sus puertas para el desarrollo de todas las actividades que se nos ocurrieron durante estos años.

También quiero agradecer a las personas que contribuyeron con su conocimiento científico en temas particulares, Caterina Ruffo, Ivan Jachmanian, Alejandro Peixoto, Juan Carlos Ramos, Madelón Portela, Rosario Duran, Claudia Ortega y Pablo Oppezzo. A Paola Panizza y Luis Bonino que formaron parte del grupo de trabajo, así como Nicolas Veiga y Gustavo Seoane con quienes me encuentro en plena colaboración en este trabajo.

Sin lugar a dudas el mayor de los agradecimientos es para las personas que me acompañaron, me brindaron su conocimiento, pero sobre todo su cariño y apoyo durante todo este proceso, sin los cuales hubiese sido un proceso menos feliz. Tengo la suerte de haber encontrado grandes amigos y grandes compañeros.

Darle las gracias a todos los “microbios”, Vale, Vicky, Mari, Gabi, MIL, Nicol, Paola, Gianna, MIS, María Julia, Salbores, César, Diegui, Bebu, DiegoR (desertor), y todos los que me debo de estar olvidando.

También darles las gracias a todos mis compañeros de Bioquímica Bea, Laura, Carmen, Karen, Ana, CeciG, Miriam, Paula, Laurita, Majo, CeciP, Stefy, Lari, GabiP, Euge, Batista,

Pablo, Ernesto, con quienes compartí el día a día los últimos 12 años, y obviamente hemos tenido nuestros encuentros y desencuentros pero siempre me han aportado a mi crecimiento personal.

Un agradecimiento muy especial para Gabi y Sonia, quienes me guiaron, desafiaron, motivaron desde lo laboral, concordando o no con todas las locuras que se nos han ocurrido durante estos años de trabajo juntos. Pero sobre todo quiero darles las gracias porque me acompañaron desde lo humano, supieron entender mis necesidades y mis tiempos. Claramente esto último es lo más destacable, en mi opinión, y en contra (como siempre) del refrán, lo que queda son las personas.

Como también hay una vida afuera del laboratorio no quiero olvidarme de agradecerle a mis juveniles que llevan literalmente toda la vida haciéndome el aguante Lu, Agus, Andre, Vicky, Flo, Fabri, Gonza, GG, Mitch. Han sido un gran apoyo para mí en cada oportunidad que hemos compartido.

Mis amigos de las 0630 el psicólogo diario tan necesario, Nico, Joaco, Martín, Fede, Negro, Julieta, que no entienden un choto de lo que hago, pero no les importa porque hay que meterle igual.

Un agradecimiento muy especial a las Karens, Sole, Sofi, Pauli y Feli, que forman una parte muy especial y que disfruto mucho de nuestros encuentros (con sus gatos).

Quiero agradecer muy particularmente a mi familia que no solo me apoyo durante esta etapa, si no que me acompaña desde siempre, y que a pesar de la distancia siempre me han recibido con un abrazo apretado y me han contenido. Por eso quiero darles un particular agradecimiento a mis tíos Anita y Lumber, que han sido mis segundos padres, y a Andrés y Meli y el Nico y Silvana con quienes la diversión está asegurada.

Mi madre y mi hermana se merecen un apartado propio porque darle las gracias se queda corto, ellas son un pilar en mi vida, me han ayudado a llegar hasta acá y me han

apoyado siempre en todas las decisiones que he tomado. Sin su compañía incondicional el camino hubiese sido muy duro.

Por último, quiero agradecerle a Ada y la hiji, mis compañeras de vida que me aguantan la cabeza y con quien compartimos mil batallas y aventuras, quien me acompaña todos los días en las locuras más impensadas.

Por todo lo que hemos compartido juntos, les doy las gracias a todos.



## Tabla de contenidos

Resumen .....	1
Introducción .....	5
Objetivos generales: .....	15
Objetivos específicos: .....	15
Capítulo 1: Purificación e identificación de lipasas de <i>Janibacter</i> R02 .....	19
1.1. Introducción al capítulo .....	19
1.1.1. Búsqueda de nuevas lipasas .....	19
1.1.2. Producción de lipasas microbianas .....	20
1.1.3. Purificación de lipasas microbianas.....	23
1.2. Objetivos del capítulo .....	26
1.2.1. Objetivo general .....	26
1.2.2. Objetivos específicos .....	26
1.3. Materiales y métodos .....	26
1.3.1. Manejo de cepas .....	26
1.3.2. Producción y purificación de lipasas de <i>Janibacter</i> R02.....	26
1.3.3. Ensayos de expresión de Lip J2.....	35
1.4. Resultados y discusión .....	38
1.4.1. Cultivo de <i>Janibacter</i> R02 .....	38
1.4.2. Purificación de enzimas a partir del sobrenadante de cultivo de <i>Janibacter</i> R02	39
1.4.3. Estudios de caracterización de la lipasa Lip J1 .....	48
1.4.4. Desarrollo de sistemas de expresión de lipasas de <i>Janibacter</i> R02 .....	53
1.5. Conclusiones del capítulo .....	86
Capítulo 2. Purificación a partir de los cuerpos de inclusión y caracterización bioquímica de Lip J2 .....	91

2.1.	Introducción.....	91
2.1.1.	Los cuerpos de inclusión, tropiezo y recompensa.....	91
2.1.2.	Lipasas extremófilas .....	96
2.2.	Objetivos del capítulo .....	98
2.2.1.	Objetivo general .....	98
2.2.2.	Objetivos específicos .....	98
2.3.	Materiales y métodos .....	98
2.3.1.	Obtención de los cuerpos de inclusión .....	98
2.3.2.	Ensayos de solubilización de los cuerpos de inclusión.....	98
2.3.3.	Protocolo de renaturalización de Lip J2 a partir de cuerpos de inclusión	99
2.3.4.	Protocolo de purificación de Lip J2 a partir de cuerpos de inclusión.....	99
2.3.5.	Definición de unidad de enzima .....	100
2.3.6.	Ensayo de actividad frente a derivados de MUF.....	100
2.3.7.	Estudio del efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática....	100
2.3.8.	Estudio del efecto del pH sobre la actividad enzimática.....	101
2.3.9.	Estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.....	101
2.3.10.	Estudio de la estabilidad frente al pH.....	101
2.3.11.	Estudio de la estabilidad frente a la temperatura.....	101
2.3.12.	Estudio del efecto de agentes desnaturalizantes, detergentes e inhibidores sobre la actividad enzimática .....	101
2.3.13.	Determinación de parámetros cinéticos $K_m$ y $k_{cat}$ .....	102
2.3.14.	Estudio de la actividad enzimática en presencia de solventes.....	102
2.3.15.	Estudio de la estabilidad en presencia de solventes .....	102
2.4.	Resultados y discusión .....	102
2.4.1.	Ensayos de solubilización de los cuerpos de inclusión.....	102
2.4.2.	Determinación de la especificidad de sustrato .....	108

2.4.3.	Estudio del efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática....	109
2.4.4.	Estudio del efecto del pH sobre la actividad enzimática.....	110
2.4.5.	Estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.....	111
2.4.6.	Estudio de la estabilidad frente al pH .....	112
2.4.7.	Estudio de la estabilidad frente a la temperatura.....	113
2.4.8.	Estudio del efecto de agentes desnaturalizantes sobre la actividad enzimática.....	114
2.4.9.	Determinación de los parámetros cinéticos .....	115
2.4.10.	Estudio de la actividad enzimática en presencia de solventes.....	115
2.4.11.	Caracterización estructural de Lip J2 .....	117
2.5.	Conclusiones del capítulo .....	119
Capítulo 3. Desarrollo de derivados inmovilizados de una lipasa de <i>Aspergillus niger</i> para su aplicación a la síntesis de biodiesel .....		123
3.1.	Introducción.....	123
3.1.1.	Inmovilización de enzimas.....	123
3.1.2.	<i>Aspergillus niger</i> y sus lipasas.....	132
3.2.	Objetivos del capítulo .....	133
3.2.1.	Objetivo general .....	133
3.2.2.	Objetivos específicos .....	133
3.3.	Materiales y métodos .....	133
3.3.1.	Definición de unidad de enzima para la lipasa de <i>Aspergillus niger</i> purificada.....	133
3.3.2.	Ensayos de actividad frente a pNP butirato .....	133
3.3.3.	Purificación de la lipasa de <i>Aspergillus niger</i> .....	133
3.3.4.	Estudio del efecto del pH sobre la actividad enzimática.....	134
3.3.5.	Estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.....	135

3.3.6.	Evaluación de la estabilidad frente a la temperatura .....	135
3.3.7.	Evaluación de la estabilidad frente al pH .....	135
3.3.8.	Evaluación de la estabilidad enzimática en presencia de hexano .....	135
3.3.9.	Ensayo de síntesis de biodiesel .....	135
3.3.10.	Síntesis de glioxil-agarosa .....	136
3.3.11.	Síntesis de MANA-agarosa .....	136
3.3.12.	Inmovilización sobre MANA-agarosa.....	137
3.3.13.	Síntesis de agarosa activada con agentes cianilantes .....	138
3.3.14.	Inmovilización sobre agarosa cianato éster activada .....	139
3.3.15.	Caracterización de los derivados inmovilizados de lipasa AMANO....	139
3.3.16.	Cromatografía gaseosa .....	140
3.4.	Resultados y discusión .....	141
3.4.1.	Purificación de la lipasa de <i>Aspergillus niger</i> .....	141
3.4.2.	Caracterización bioquímica de la lipasa AMANO .....	144
3.4.3.	Desarrollo de derivados inmovilizados de la lipasa AMANO .....	154
3.5.	Conclusiones del capítulo .....	159
Capítulo 4. Inmovilización de la lipasa BTL 2 sobre nanopartículas magnéticas para su aplicación a ensayos de hipertermia magnética .....		163
4.1.	Introducción.....	163
4.2.	Objetivos del capítulo .....	168
4.2.1.	Objetivo general .....	168
4.2.2.	Objetivos específicos .....	168
4.3.	Materiales y métodos .....	168
4.3.1.	Definición de unidad de enzima para la lipasa 2 de <i>Geobacillus thermocatenulatus</i> (BTL2) .....	168
4.3.2.	Ensayos de actividad frente a pNP butirato .....	168

4.3.3.	Determinación de la concentración de proteína .....	168
4.3.4.	Producción de la lipasa BTL 2 de <i>Geobacillus thermocatenulatus</i> .....	169
4.3.5.	Purificación de la lipasa BTL 2 de <i>Geobacillus thermocatenulatus</i> .....	169
4.3.6.	Estudio del efecto del Tritón X-100 sobre la actividad enzimática .....	170
4.3.7.	Estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.....	170
4.3.8.	Estudio del efecto del pH sobre la actividad enzimática.....	170
4.3.9.	Estudio del efecto del efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática.....	170
4.3.10.	Evaluación de la estabilidad frente a la temperatura.....	171
4.3.11.	Evaluación de la estabilidad frente al pH .....	171
4.3.12.	Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro (NPs) .....	171
4.3.13.	Funcionalización de NPs con (3-Aminopropil) trietoxisilano (APTES)	172
4.3.14.	Funcionalización de NPs-APTES con 4-aminofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (NPG)	172
4.3.15.	Inmovilización de la variante 25 de BTL 2 sobre NPG .....	172
4.3.16.	Funcionalización de NPs-APTES con sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) (ciclohexano-1-carboxilato) (sulfo-SMCC) .....	173
4.3.17.	Cuantificación de grupos tiol mediante técnica con 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) .....	173
4.3.18.	Inmovilización sobre NPs funcionalizadas con sulfo-SMCC (NP-S).....	173
4.3.19.	Ensayos de actividad de los derivados frente a pNP butirato .....	174
4.3.20.	Ensayos de hipertermia magnética .....	174
4.4.	Resultados y discusión .....	176
4.4.1.	Purificación de las variantes de la lipasa BTL 2 de <i>Geobacillus thermocatenulatus</i> .....	176
4.4.2.	Caracterización bioquímica de la variante 27 lipasa BTL 2 de <i>Geobacillus thermocatenulatus</i> .....	178

4.4.3.	Funcionalización de nanopartículas de óxido de hierro.....	183
4.4.4.	Inmovilización de BTL 2 sobre nanopartículas de óxido de hierro .....	188
4.4.5.	Ensayos de hipertermia magnética .....	193
4.5.	Consideraciones finales del capítulo .....	193
Capítulo 5. Serendipia: ¿es la arginina capaz de catalizar la hidrólisis de p-nitrofenil butirato?.....		
		197
5.1.	Introducción.....	197
5.2.	Objetivos del capítulo .....	200
5.2.1.	Objetivo general .....	200
5.2.2.	Objetivos específicos .....	200
5.3.	Materiales y métodos .....	200
5.3.1.	Reactivos utilizados .....	200
5.3.2.	Preparación de los reactivos .....	200
5.3.3.	Ensayo de hidrólisis de pNP butirato.....	201
5.3.4.	Ensayo de hidrólisis de derivados de metil umbeliferona .....	201
5.3.5.	Búsqueda conformacional de las moléculas involucradas.....	201
5.3.6.	Docking molecular .....	202
5.3.7.	Dinámica molecular .....	202
5.4.	Resultados.....	203
5.4.1.	Liberación de pNP mediada por arginina .....	203
5.4.2.	Estudio de la capacidad de catálisis de análogos de la arginina .....	205
5.4.3.	Evaluación de la capacidad catalítica de la arginina sobre otros sustratos	208
5.4.4.	Búsqueda conformacional y docking molecular de la arginina y pNP Butirato	209
5.5.	Discusión .....	213

Conclusiones y perspectivas .....	217
5.4.5. Medios de cultivo .....	223
5.4.6. ....	225
Bibliografía.....	229



## Índice de figuras

Figura I.1. Reacciones catalizadas por lipasas. ....	9
Figura 1.1. Ciclo de PCR utilizado para la amplificación del gen codificante para Lip J2. .....	35
Figura 1.2. Curva de crecimiento de Janibacter R02 y producción de actividad lipasa en el sobrenadante de cultivo. ....	38
Figura 1.3. Evaluación del proceso de precipitación con acetona mediante PAGE-SDS. gel homogéneo 12,5%, revelado con técnica de plata. ....	40
Figura 1.4. Cromatografía de intercambio iónico en columna HiTrap Q 5mL. ....	41
Figura 1.5. Evaluación del proceso de intercambio iónico realizado mediante PAGE-SDS en gel homogéneo 12,5% revelado con Coomassie. ....	42
Figura 1.6. Isoelectroenfoque en gel PhastGel® IEF Pre-cast 3 – 9. ....	42
Figura 1.7. Cromatogramas de la CGF. ....	45
Figura 1.8. Evaluación de las fracciones con actividad lipasa obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular mediante PAGE-SDS. gel homogéneo 20%, revelado con técnica de plata. ....	46
Figura 1.9. Electroforesis bidimensional. ....	47
Figura 1.10. Ensayo de pH óptimo para Lip J1. ....	49
Figura 1.11. Estabilidad frente al pH. ....	49
Figura 1.12. Estabilidad frente a la temperatura. ....	50
Figura 1.13. Esquema del proceso de clonado del gen codificante para Lip J2. ....	54
Figura 1.14. Esquema de la construcción utilizada en el desarrollo del sistema de expresión de Lip J2 en E. coli BL21 DE3. ....	55
Figura 1.15. Análisis del índice de adaptación de codones del gen de Lip J2 amplificado a partir del ADN genómico de Janibacter R02. ....	56

Figura 1.16. Distribución de la frecuencia de codones presentes en el gen, para la cepa de <i>E. coli</i> BL 21 (DE3) .....	56
Figura 1.17. PAGE-SDS gel homogéneo 12,5 % del proceso de expresión de Lip J2, tinción con Coomassie.....	58
Figura 1.18. PAGE-SDS gel homogéneo 7,5%, tinción con Coomassie.....	59
Figura 1.19. PAGE-SDS gel homogéneo 12,5 %, tinción con Coomassie.....	60
Figura 1.20. Modelo tridimensional de Lip J2. ....	61
Figura 1.21. Esquema de la construcción desarrollada para la expresión en <i>Pseudomonas</i> sp. en base al vector pBBR1MCS y el gen codificante para Lip J2.....	63
Figura 1.22. Ensayo de actividad cualitativo utilizando MUF-butirato como sustrato..	64
Figura 1.23. PAGE-SDS, gel homogéneo 12,5% tinción con Coomassie.....	65
Figura 1.24. Esquema del vector Lip J2 en pPINKalpha HC, construido para el desarrollo de los mutantes del sistema de expresión PichiaPink.....	67
Figura 1.25. Electroforesis en gel de agarosa 1%.....	68
Figura 1.26. Electroforesis en gel de agarosa 1%.....	69
Figura 1.27. Curva de crecimiento de los recombinantes de la cepa PichiaPink 3, utilizando metanol (10 mg/mL) como fuente de carbono.....	71
Figura 1.28. Curva de crecimiento de los recombinantes de la cepa PichiaPink 3, utilizando metanol (16 mg/mL) como fuente de carbono.....	72
Figura 1.29. Curva de crecimiento de los mutantes 1, 3 y 9 de la cepa 3 del sistema PichiaPink.....	73
Figura 1.30. Curva de crecimiento de los recombinantes 1, 3 y 9 de la cepa 3 del sistema PichiaPink.....	73
Figura 1.31. Curva de crecimiento del mutante 3 de la cepa 3 del sistema PichiaPink.	75
Figura 1.32. PAGE-SDS, gel mini-PROTEAN TGX stain free homogéneo 12%. ....	77
Figura 1.33. Vectores construidos en base a pPICZαA y pGAPZαA para el desarrollo de sistemas de expresión de Lip J2 basadas en la cepa <i>Pichia pastoris</i> X-33.....	78

Figura 1.34. Gel de agarosa 0,8%. PCR confirmatoria de la presencia del gen de Lip J2 en los mutantes de la cepa X-33 de <i>Pichia pastoris</i> . .....	79
Figura 1.35. Gel de agarosa 0,8%. PCR confirmatoria de la presencia del gen de Lip J2 en los mutantes de la cepa X-33 de <i>Pichia pastoris</i> . .....	80
Figura 1.36. Vector pESC-URA -LipJ2 empleado en la construcción de los sistemas de expresión basados en cepas de <i>S. cerevisiae</i> .. .....	82
Figura 1.37. PAGE-SDS, gel homogéneo 12,5% tinción con Coomassie coloidal. ....	83
Figura 2.1. Evaluación del proceso de solubilización de los cuerpos de inclusión mediante PAGE-SDS en gel homogéneo 12,5% revelado con Coomassie coloidal .....	103
Figura 2.2. Evaluación del proceso de purificación de Lip J2 mediante IMAC, realizado mediante PAGE-SDS en gel homogéneo 12,5% revelado con Coomassie coloidal. ....	106
Figura 2.3. Cromatograma de elución de la cromatografía de exclusión molecular realizada a Lip J2 purificada por IMAC. ....	108
Figura 2.4. Efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática de Lip J2. ....	109
Figura 2.5. Determinación del pH óptimo para Lip J2. ....	110
Figura 2.6. Determinación de la temperatura óptima para Lip J2. ....	112
Figura 2.7. Estabilidad frente al pH. ....	113
Figura 2.8. Estabilidad frente a la temperatura. ....	114
Figura 2.9. Efecto del etanol en la actividad enzimática de Lip J 2. ....	115
Figura 2.10. Efecto del glicerol sobre la actividad enzimática de Lip J2.....	116
Figura 3.1. A, mecanismo de activación de la agarosa por el método CDAP para inmovilización de proteínas. B, inmovilización de enzimas en soporte cianato éster activado. ....	127
Figura 3.2. Síntesis de Mana-agarosa.....	130
Figura 3.3. Inmovilización de enzimas sobre MANA-agarosa. A, a través de grupos carboxilato. B, a través de grupos aldehído .....	131
Figura 3.4. Evaluación cualitativa de la actividad del preparado AMANO A12. ....	141

Figura 3.5. PAGE-SDS del proceso de purificación de la lipasa de <i>Aspergillus niger</i> , revelado con Coomassie coloidal. ....	142
Figura 3.6. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.....	145
Figura 3.7. Ensayo de estabilidad frente a la temperatura para la lipasa AMANO.....	146
Figura 3.8. Actividad de la lipasa AMANO en presencia de alcoholes. ....	148
Figura 3.9. TLC de las condiciones correspondientes al diseño factorial de la Tabla 3.2, revelada en cámara de iodo. ....	152
Figura 3.10. Ensayo de estabilidad de la lipasa AMANO a pH 10.....	154
Figura 3.11. Estabilidad de los derivados inmovilizados y la enzima en solución, frente a la temperatura (40 °C) .....	158
Figura 4.1. Efecto de la aplicación de un campo magnético sobre materiales ferromagnéticos y superparamagnéticos.....	165
Figura 4.2. Evaluación del proceso de purificación de la variante 27 de BTL2, realizado mediante PAGE-SDS en gel homogéneo 12,5%, revelado con Coomassie coloidal.....	177
Figura 4.3. Estudio del efecto del Tritón X-100 sobre la actividad enzimática. ....	178
Figura 4.4. Estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.....	179
Figura 4.5. Estudio del efecto del pH sobre la actividad enzimática.....	180
Figura 4.6. Efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática.....	181
Figura 4.7. Estudio de la estabilidad frente a la temperatura.....	182
Figura 4.8. Estudio de la estabilidad frente al pH.....	182
Figura 4.2. A Esquema del proceso de funcionalización de las NP con aminotrieto silano. B Esquema de inmovilización de la variante 25 de BTL en NP funcionalizadas con galactosa, mediante afinidad biológica. C esquema de inmovilización de las variantes 26, 27 y 28 de BTL 2 en NP funcionalizadas con sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) (ciclohexano-1-carboxilato).....	187
Figura 5.1. Estructura supramolecular autoensamblada de fenilalanina y Zn, capaz de catalizar la hidrólisis de pNP acetato. (Extraído de “A single amino acid enzyme”)....	198

Figura 5.2. Efecto de la concentración de arginina sobre la velocidad de hidrólisis de pNP butirato .....	203
Figura 5.3. Estructura química de los diferentes catalizadores evaluados. ....	205
Figura 5.4. Efecto de la concentración de citrulina sobre la velocidad de hidrólisis de pNP butirato .....	206
Figura 5.5. Efecto de la concentración de metilarginina sobre la velocidad de hidrólisis de pNP butirato .....	207
Figura 5.6. Efecto de la concentración de dimetilarginina simétrica sobre la velocidad de hidrólisis de pNP butirato. ....	208
Figura 5.7. Estructura de los compuestos utilizados como sustrato.....	209
Figura 5.8. Esquema del perfil de reacción de arginina con pNP Butirato, a pH 10,0, basado en el modelado de la reacción. ....	211
Figura 5.9. Diagrama de energía en función de la coordenada de reacción para la hidrólisis de pNP butirato mediada por arginina según surge del modelado realizado. ....	212

## Índice de tablas

Tabla 1.1. Cepas utilizadas en el presente trabajo.....	32
Tabla 1.2. Vectores utilizados en el presente trabajo.....	33
Tabla 1.3. Cebadores utilizados en el presente trabajo.....	33
Tabla 1.4. Cepas recombinantes construidas en el presente trabajo.....	34
Tabla 1.5 Resumen del estudio de masas de los péptidos aislados a partir de la fracción 34 del PA.....	48
Tabla 1.6. Porcentaje de ácido oleico presente en la mezcla de reacción luego de 24 horas.....	51
Tabla 1.7. Estudio del efecto en la expresión de Lip J2 a partir del clon AC IV por variación en las condiciones de cultivo e inducción.....	59
Tabla 1.8 Estudio de retención de plásmido para las cepas YPH 499 y 15 C.....	85
Tabla 1.9. Resumen de ensayos y resultados obtenidos a partir de los sistemas de expresión desarrollados.....	87
Tabla 2.1. Evaluación del proceso de solubilización de los CI lavados y purificación de Lip J2.....	107
Tabla 3.2. Evaluación del proceso de purificación de la lipasa AMANO.....	143
Tabla 3.2 Evaluación de las condiciones de síntesis de biodiesel.....	150
Tabla 3.3. Evaluación de los procesos de inmovilización de la lipasa AMANO.....	155
Tabla 4.1. Mutantes de BTL 2.....	166
Tabla 4.2. Evaluación del proceso de inmovilización de la variante 25 de BTL 2 en NPG.....	188
Tabla 4.3. Evaluación del proceso de inmovilización de las variantes 26, 27 y 28 de BTL 2, en la condición 1.....	191
Tabla 4.4. Evaluación del proceso de inmovilización de las variantes 26, 27 y 28 de BTL 2, en la condición 2.....	192

Tabla 5.1. Comparación del comportamiento de los compuestos evaluados como catalizador .....	208
--	-----



## Abreviaciones

AE – actividad expresada  
AI – actividad inmovilizada  
AIM – medio de autoinducción  
APTES - (3-Aminopropil) trietoxisilano  
BTL 2 – lipasa 2 de *Geobacillus thermocatenulatus*  
CAI – índice de adaptación de codones  
CDAP – tetrafluoruro de 1-cyano-(4-dimetilamino)-piridinio  
CGF – cromatografía de gel filtración  
CI – cuerpos de inclusión  
CIN – producción de enzimas a partir de cultivo de células inmovilizadas  
Da – Daltons (g/mol)  
DO<sub>600</sub> – absorbancia a 600 nm  
DTNB - 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)  
DTT – ditioneitol  
EDC – 1-etil 3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida  
EDTA – ácido etilendiaminotetraacético  
FAEEs – ésteres etílicos de ácidos grasos  
FI – fracción insoluble  
FML – fermentación en medio líquido  
FMS - fermentación en medio sólido  
FS – fracción soluble  
GC – cromatografía gaseosa  
GSH – glutatión reducido  
GSSG – glutatión oxidado  
HIC – cromatografía por interacciones hidrofóbicas  
IMAC – cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados  
IPTG - iso-β-D-1-tiogalactopiranosido  
K<sub>cat</sub> – constante catalítica  
K<sub>m</sub> – constante de Michaelis Menten  
MANA-agarosa – monoaminometil-N-aminometil agarosa  
MUF butirato – 4-metilumbeliferil butirato  
MWM – marcador de peso molecular  
NCBI – National Center for Biotechnology Information  
NPs – nanopartículas

ON – over night

PA – precipitado con acetona, del sobrenadante de cultivo de *Janibacter* R02

PAGE-SDS – electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

PCR – reacción en cadena de la polimerasa

PD-10 – columna de gelfiltración descartable, comercial, empacada con Sephadex G-25 Medio

PF – *primer forward*

PMSF – fluoruro de fenilmetilsulfonilo

pNP butirato – 4-nitrofenil butirato

PR – *primer reverse*

SDS – dodecil sulfato de sodio

Suction dried – secado a vacío en embudo con placa de vidrio sinterizado

sulfo-SMCC - sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) (ciclohexano-1-carboxilato)

TLC – cromatografía en capa fina

UE – unidad de enzima

## Resumen

La biocatálisis, también conocida como catálisis enzimática o biotransformación, es el uso de enzimas para catalizar reacciones químicas. El campo de la biocatálisis crece con el afán de desarrollar procesos químicos y biotecnológicos más eficientes y de menor impacto ambiental. El uso de enzimas aisladas o células enteras como catalizadores ofrece varias ventajas, son muy eficaces, funcionan a temperaturas y condiciones de pH suaves y en entornos acuosos, ofrecen una gran especificidad (quimio-, regio-, diastereo- y enantioespecíficas) lo que las torna herramientas sumamente interesantes en diferentes procesos industriales.

Las lipasas (triacilglicerol hidrolasas, EC 3.1.1.3) son una importante clase de enzimas con un gran número de aplicaciones en biotecnología. Una de las aplicaciones con potencial impacto industrial es la producción de biocombustibles. El biodiesel se sintetiza a partir de triglicéridos de distinto origen, mediante transesterificación con alcoholes de cadena corta como metanol o etanol, actualmente el proceso más utilizado su síntesis es la catálisis química homogénea. Las lipasas son una alternativa con potencial para conducir este proceso, mediante su aplicación es posible obtener una mezcla de esteres dentro de los parámetros de calidad requeridos para este combustible. Con el fin de lograr la expansión de esta metodología a nivel industrial es fundamental desarrollar biocatalizadores eficientes y económicos.

El desafío de desarrollar nuevos biocatalizadores aplicables a nivel industrial pasa por la búsqueda de enzimas con características bioquímicas tales que se puedan adaptar a los sistemas de producción y por desarrollo de biocatalizadores inmovilizados de las mismas, que aumente la eficiencia del proceso.

El presente trabajo se centró en la identificación, purificación y desarrollo de biocatalizadores inmovilizados de lipasas microbianas, con las características necesarias para su aplicación a la síntesis de biodiesel. Se desarrollaron estrategias bioquímicas y moleculares para la identificación, producción, y purificación de enzimas con actividad lipasa a partir de sobrenadante de medio de cultivo de una cepa de *Janibacter sp*, el cual demostró capacidad de conducir la síntesis de biodiesel.

Además, se diseñaron y desarrollaron estrategias de inmovilización de otras lipasas, las cuales se basaron en diferentes químicas de unión. Los derivados inmovilizados

obtenidos fueron evaluados respecto a su capacidad de estabilizar a la enzima inmovilizada frente a su exposición a la temperatura, respecto a la enzima en solución. A partir de las estrategias bioquímicas diseñadas se purificaron fracciones con actividad lipasa, seleccionándose particularmente una de ellas (Lip J1) la cual fue caracterizada parcialmente. Mientras que la estrategia molecular permitió la identificación del gen codificante para una segunda enzima (Lip J2), para la cual se desarrollaron diferentes sistemas de expresión a partir de los cuales fue posible purificarla. Esta enzima presentó características bioquímicas interesantes, siendo catalogada como halófila, basófila e hipertermófila, mientras que su caracterización estructural la clasificó como el primer miembro de la familia XVII de lipasas. Las dos enzimas identificadas a partir de *Janibacter* R02 (Lip J 1 y Lip J2) presentaron características bioquímicas distintas e interesantes, que las convierten en candidatas para su aplicación a diferentes procesos químicos.

Por otro lado, el trabajo centrado en lipasas de *Aspergillus niger* permitió la obtención de tres derivados inmovilizados de forma covalente a través de tres químicas de unión diferentes, utilizando agarosa como soporte. Dos de las estrategias utilizadas mostraron una eficiencia de inmovilización muy buena con porcentajes de actividad expresada de 69%. Los tres derivados enzimáticos fueron evaluados frente a la temperatura, dos de ellos mostraron una importante estabilización térmica a 40 °C, lo cual los posiciona como buenos candidatos para su aplicación en la síntesis de biodiesel.

También fueron realizados ensayos de inmovilización de la lipasa BTL 2 de *Geobacillus thermocatalatus* sobre nanopartículas con propiedades superparamagnéticas, para su aplicación a ensayos de nanocalentamiento magnético, a partir del cual se estudió diferentes técnicas de funcionalización del soporte y su aplicación a la hipertermia magnética.

Finalmente se muestran los resultados acerca de la capacidad catalítica de la arginina sobre la hidrólisis del sustrato modelo pNP Butirato. Este hecho fue descubierto de forma fortuita y su novedad nos llevó a profundizar en las características de este fenómeno, logrando proponer y evaluar un modelo que explique la interacción que se da entre estos dos compuestos. A nuestro entender este sería el tercer reporte de un aminoácido con capacidad catalítica.

# Introducción

---



## Introducción

Hoy en día resulta innegable el rol central que tienen los productos químicos en la vida cotidiana, como componentes de productos que nos proporcionan confort y calidad de vida, los cuales son consumidos y producidos cada vez en mayor cantidad. Frecuentemente para el desarrollo de estos productos resulta necesario el empleo de procesos que involucran la utilización de reactivos peligrosos o contaminantes para el medioambiente. De la mano con el aumento de la producción, ha crecido también la consciencia y responsabilidad de las empresas productoras y los consumidores sobre el impacto ambiental que este desarrollo trae aparejado. Es por ello que constantemente se buscan alternativas menos contaminantes, procesos más eficientes, que acompañen los lineamientos legales impuestos para garantizar la salud de la población, sin dejar de lado el confort que el consumidor recibe por el uso de los productos, ni el beneficio económico que se obtiene en la cadena comercial de los mismos (Gurung, Ray, Bose, & Rai, 2013; Jemli, Ayadi-Zouari, Hlima, & Bejar, 2016).

En 1998 *Anastas y Warner* (Anastas & Warner, 1999), establecieron los doce principios de la química verde, los cuales deben ser tomados en cuenta a la hora de desarrollar, modificar o sustituir procesos químicos existentes por otros más amigables con el medioambiente. En esa dirección, la biocatálisis entendida como la aplicación de enzimas a la catálisis de reacciones químicas, se ha desarrollado enormemente en las últimas décadas. Las enzimas poseen características deseables para su aplicación en procesos industriales a diferentes escalas, permitiendo el desarrollo de tecnologías que cumplan con los principios de la química verde (Mandal, 2021). Son muy eficientes, lo que permite alcanzar elevadas velocidades de reacción utilizando baja cantidad de catalizador. Aportan a la economía del proceso ya que trabajan en condiciones de pH y temperatura moderados, así como en medios acuosos, aunque muchas de ellas son estables a elevadas temperaturas, pH extremo o en presencia de solventes orgánicos. Desde el punto de vista de la actividad que presentan, son muy específicas catalizando una o un tipo de reacciones que están mecanísticamente relacionadas, y en las condiciones adecuadas son capaces de catalizar reacciones sobre sustratos diferentes a los naturales. La mayoría de las enzimas son quimio- regio y estereoselectivas lo que las hace una herramienta muy deseada en química fina (Bornscheuer, 2002; Faber, 2011;

Lewkowicz, 2011; Reetz, 2016b; G. Yang & Ding, 2014). Si bien algunas enzimas necesitan del suministro constante de cofactores, es posible desarrollar procesos industriales multienzimáticos o de cascadas de reacción donde se garantizan las condiciones necesarias para la catálisis, aportando además al reciclado de dichos cofactores.

Además de las ventajas operativas también existen ventajas económicas, ya que en muchos casos los procesos enzimáticos han sustituido metodologías basadas en el uso de complejos de metales transición. No obstante, la utilización de algunas enzimas puede ser costoso, pero el reemplazo de los catalizadores homogéneos y la disminución de los residuos contaminantes logrados por su utilización redundan en beneficios económicos y medioambientales. Para atacar directamente el costo del biocatalizador existen diversas estrategias. La producción heteróloga del catalizador, y su optimización aportan a reducir el costo de la enzima, mientras que la evolución dirigida permite modificar características, como estabilidad o actividad frente a determinados sustratos, incluso la estereoselectividad, lo que conduce a un aumento de la eficiencia del proceso. Por otra parte, el desarrollo de derivados inmovilizados de la enzima tiene muchos beneficios para su aplicación a los diferentes procesos, aportando a mejorar la estabilidad de la enzima frente a los factores ambientales como pH, temperatura, solventes o sales. La fácil remoción de derivado permite una fina regulación del avance de la reacción, evitando el calentamiento como método de finalización del proceso, protegiendo así posibles productos termosensibles o la formación de sustancias indeseadas. La separación del derivado permite además su reutilización en posteriores procesos, o hasta la reutilización del soporte utilizado en casos particulares, aportando así a la economía del proceso (Facin, Melchior, Valério, Oliveira, & Oliveira, 2019; Filho, Silva, & Guidini, 2019; Romero-Fernández & Paradisi, 2020; Woodley, 2019, 2020). Estas características se traducen también en datos de mercado, donde la venta de enzimas con fines industriales alcanzó U\$S 8,7 billones en 2019 (aproximadamente el 15 % del PBI de Uruguay en ese año) y se espera que crezca un 70% para 2027 (Dewan, 2011; Manjrekar, Wadekar, & Sumant, 2021). Estos datos marcan la tendencia del sector industrial a volcar sus procesos hacia la aplicación de enzimas, y al desarrollo de nuevos procedimientos basados en ellas. Dentro de este mercado, la familia de enzimas hidrolíticas (proteasas, glicosidasas, lipasas, entre otras) es la más comercializada en

términos de volumen y costo. Dentro de esta familia atraen la atención particularmente las lipasas, ya que son el tercer tipo de enzimas más comercializado en términos de volumen pero el primero en valor económico, estimándose en 2020 un valor de mercado de U\$S 590 millones (Markets and Markets, 2015; Rohan, 2017). La relevancia económica que la industria le otorgó a las lipasas se debe sin duda a sus remarcables características como biocatalizadores que le permiten participar de numerosos procesos productivos.

### Lipasas como catalizadores

Las lipasas (EC 3.1.1.3) y las carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) son enzimas que naturalmente actúan hidrolizando ésteres de ácidos grasos. La principal diferencia entre estos dos grupos reside en que mientras las lipasas prefieren ésteres de ácidos grasos de cadena larga, las estererasas actúan sobre ésteres de ácidos grasos de cadena corta; a pesar de esta diferencia son denominadas en conjunto enzimas lipolíticas (Castilla, Rodríguez, & Irazoqui, 2021).

Desde el punto de vista estructural, las lipasas pertenecen a la familia de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas conformadas por ocho hojas  $\beta$  paralelas rodeadas por hélices  $\alpha$  a cada lado conformando el dominio  $\alpha/\beta$  característico de estas enzimas. Si bien puede haber variaciones entre diferentes enzimas, este dominio es altamente conservado para la familia de las lipasas. El dominio  $\alpha/\beta$  contiene los aminoácidos responsables de la catálisis, los cuales son denominados triada catalítica y se encuentran siempre en la misma región del dominio. La triada catalítica está compuesta por un aminoácido que actúa como nucleófilo (serina, cisteína, o ácido aspártico), un aminoácido ácido y una histidina, la cual es altamente conservada. Adicionalmente el aminoácido nucleofílico forma parte de un pentapéptido altamente conservado constituido de la siguiente forma, sm-X-Nu-X-sm donde sm es un residuo pequeño, usualmente glicina, X puede ser cualquier aminoácido y Nu es un residuo nucleofílico, usualmente serina (Borrelli & Trono, 2015; Jaeger & Reetz, 1998; Nardini & Dijkstra, 1999; Ollis et al., 1992).

Algunas lipasas muestran un aumento de actividad en presencia de interfases polar/apolar, este fenómeno denominado activación interfacial se produce por la presencia de un dominio particular llamado tapa (*lid domain*). La tapa protege el sitio

activo del medio hidrofílico, pero en determinadas condiciones ambientales sufre un cambio conformacional que deja expuesto el sitio activo permitiendo la entrada del sustrato. La estructura del dominio tapa varía su conformación y tamaño dependiendo de la enzima, y es utilizado para clasificar a las diferentes lipasas en subgrupos, según la secuencia, estructura y funcionalidad (Borrelli & Trono, 2015; Khan et al., 2017).

Generalmente las lipasas presentan buena estabilidad frente a condiciones adversas de pH, temperatura o presencia de solventes orgánicos (Castilla et al., 2021). Además, en las condiciones adecuadas presentan la versatilidad necesaria para catalizar reacciones diferentes a la natural, como esterificación, transesterificación, interesterificación, acidólisis, aminólisis o alcoholólisis, aceptando sustratos diferentes a los naturales (*Figura 1.1*). Esto, sumado a su químic-, regio y estereoespecificidad, posiciona a las lipasas como una poderosa herramienta en el campo de la biocatálisis, siendo posible su aplicación a diferentes procesos industriales (Bezborodov & Zagustina, 2016; Boland, Fröbl, & Lorenz, 1991; Castilla et al., 2017; Chandra, Enespa, Singh, & Arora, 2020; Gotor-Fernández & Gotor, 2008; Houde, Kademi, & Leblanc, 2004; Khan et al., 2017).

Esta versatilidad queda demostrada al listar algunos de los campos en las que se aplican. En la industria alimentaria son utilizadas para el desarrollo de sabores y olores, así como para la hidrólisis selectiva de triglicéridos para mejorar la textura de los alimentos (Guerrand, 2017; Houde et al., 2004; Jaeger & Reetz, 1998; Thapa et al., 2019; Undurraga, Markovits, & Erazo, 2001). En el proceso de producción de la pulpa de celulosa, las lipasas son aplicadas para la remoción del pitch que se libera durante el pretratamiento de la madera (Ekman & Holmbom, 2000; Gutiérrez, Del Río, & Martínez, 2009; Gutiérrez, del Río, & Martínez, 2011; Nigam, 2013; Ramnath, Sithole, & Govinden, 2017).

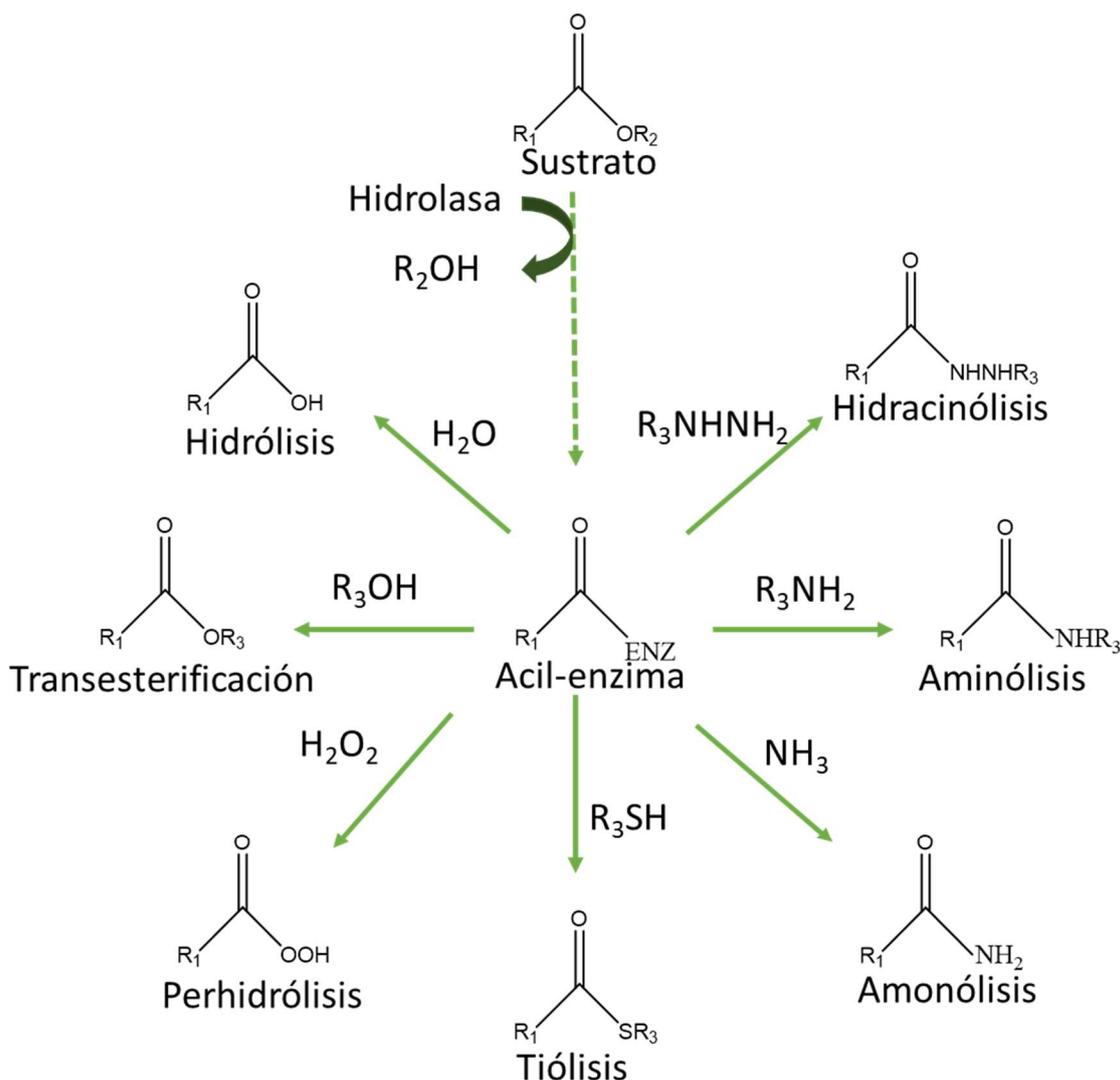


Figura 1.1. Reacciones catalizadas por lipasas. Tomado de Patel, Ramesh. *Green Biocatalysis*(2016) capítulo Enantioselective Acylation of Alcohol and Amine Reactions in Organic Synthesis Vicente Gotor-Fernández and Vicente Gotor John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey

Tal vez el campo que más ha explorado las lipasas como herramienta biocatalítica sea el farmacéutico y de química fina, donde se ha aprovechado al máximo la quimio-, regio- y estereoselectividad, así como su capacidad de aceptar sustratos diferentes a los naturales como, dioles,  $\alpha$  y  $\beta$  hidroxiacidos, cianohidrinás, clorhidrinás, diesteres, lactonas, aminas, diaminas, aminoalcoholes, entre otros. Además de la promiscuidad catalítica que demuestran, su capacidad para actuar sobre un sustrato proquiral para llevar a cabo la resolución de una mezcla racémica, han potenciado su incorporación a los procesos de síntesis de medicamentos para el tratamiento de diferentes afecciones como tratamiento de algunos tipos de cáncer (Paclitaxel, Crizotinib), anticonvulsionante

(Pregabalina, GABOB), hipertensión (Prosimpal, Piperoxam, Dibozane, Doxazosina), colesterol (Ezetimibe), coagulación (Tromboxano), obesidad (Carnitina), ansiedad (Duloxetina, Nebracetam), inflamación y analgésico (Naproxeno, Ibuprofeno), antibióticos (Rapamicina, Cloramfenicol, Thiamfenicol), en todos estos casos el efecto farmacológico se debe a un isómero y una lipasa participa en la obtención del isómero de interés. Lejos de ser una lista exhaustiva queda claro el papel que juegan las lipasas en este rubro (Boland et al., 1991; Carvalho et al., 2015; Chandra et al., 2020; Contesini et al., 2020; Faber, 2011; Jaeger & Reetz, 1998; Kazlauskas & Bornscheuer, 2008; Melani, Tambourgi, & Silveira, 2020).

La industria de los productos de limpieza ha hecho uso de las lipasas desde hace mucho tiempo, incluyéndola como componente de limpieza para suciedad oleosa. Hoy en día, se han desarrollado incluso detergentes biotecnológicos que combinan diferentes tipos de enzimas, entre ellas lipasas. Estos han demostrado ser más eficientes que los detergentes clásicos, además de ser amigables con el medioambiente, trabajar a temperaturas bajas y producir efluentes con baja demanda química de oxígeno. Las características más buscadas para lipasas aplicables a esta industria son su estabilidad y actividad en un amplio rango de pH y temperaturas, la tolerancia a agentes surfactantes y agentes blanqueadores, así como su capacidad de aceptar diferentes sustratos, entre otras (Al-Ghanayem & Joseph, 2020; Jaeger et al., 1994; Jaeger & Reetz, 1998; Naganthran, Masomian, Rahman, Ali, & Nooh, 2017; Nerurkar, Joshi, Pariti, & Adivarekar, 2013; Niyonzima & More, 2015; H. S. Olsen & Falholt, 1998; Saeki, Ozaki, Kobayashi, & Ito, 2007; Sahay & Chouhan, 2018).

Otro campo de aplicación de lipasas es la producción de biodiesel. El biodiesel se sintetiza a partir de triglicéridos de distinto origen, mediante transesterificación con alcoholes de cadena corta como metanol o etanol. Actualmente, el proceso más utilizado para la síntesis de biodiesel es la catálisis química homogénea, utilizando bases como NaOH o KOH, o ácidos como H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Este método resulta eficiente, pero presenta varios inconvenientes. La presencia de ácidos grasos libres y de agua en el material de partida disminuye el rendimiento de la reacción, limitando las fuentes de triglicéridos que se pueden utilizar, demandando aceites refinados como materia prima. El requerimiento de alcoholes secos representa un inconveniente, el metanol seco, es un derivado de la industria petroquímica, con lo cual se mantiene la dependencia de esta

industria. La catálisis química homogénea, genera un gran volumen de efluentes contaminantes, y la recuperación del glicerol, único subproducto comercializable de la reacción es difícil. Por estas razones se han explorado alternativas que estén alineadas con los estándares ambientales y económicos necesarios (Adamczyk & Grote, 1996; Helwani, Othman, Aziz, Fernando, & Kim, 2009; Leung, Wu, & Leung, 2010; Nielsen, Brask, & Fjerbaek, 2008).

La catálisis enzimática es una alternativa con potencial para conducir este proceso. Mediante la utilización de lipasas es posible lograr una catálisis eficiente, obteniendo una mezcla de ésteres dentro de los parámetros requeridos por las normas estándar para la calidad de biodiesel. Los requisitos de materias primas son menores que para la catálisis química, pudiendo utilizarse grasas y aceites de diversas calidades, incluyendo desechos industriales. La presencia de bajas concentraciones de agua en el alcohol tiene un efecto beneficioso, con lo cual puede plantearse el uso del bioetanol, eliminando el uso de derivados petroquímicos. Además, se recupera por simple decantación glicerol de muy alta calidad, lo que valoriza este subproducto y permite la disminución de los efluentes del proceso. El principal obstáculo para la producción enzimática industrial de biodiesel está relacionado con el costo de la enzima a utilizar, directamente asociado a sus características de estabilidad durante el tiempo que insuma la síntesis (18 a 24 horas) y en las condiciones del proceso como temperatura (20 a 60 °C), y la presencia de solventes (etanol, metanol, hexano, glicerol). Actualmente las lipasas de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor miehei*, *Geotricum candidum*, *Candida rugosa*, *Rhizomucor mieheim*, *Aspergillus niger* están disponibles comercialmente y son capaces de conducir la síntesis de biodiesel, pero su falta de estabilidad en las condiciones de producción, impiden su aplicación a nivel industrial. Únicamente preparaciones basadas en las lipasas de *Callera trans* y *Candida antarctica* han alcanzado su aplicación a escala industrial, siendo esta última la única que continúa siendo aplicada en un proceso comercial de biodiesel. Cabe destacar que la lipasa CALB de *C. antártica* (Novozyme 435) fue mejorada mediante un proceso de diseño racional, para el mejoramiento de sus características que posibilitaron su aplicación en este proceso (Dossat, Combes, & Marty, 1999; Du, Xu, & Liu, 2003; Nelson, Foglia, & Marmer, 1996; Nouredini, Gao, & Philkana, 2005; Park, Joo, Park, & Yoo, 2012; Poppe, Fernandez-Lafuente, Rodrigues, & Ayub, 2015; Priyanka, Tan, Kinsella, Henahan, & Ryan,

2019; Scherer, 2014; Soumanou & Bornscheuer, 2003; Tan, Lu, Nie, Deng, & Wang, 2010).

Por lo expresado hasta el momento, queda en evidencia la relevancia de las lipasas en el ámbito industrial. Así como los desafíos para su consolidación en nuevas áreas de interés. En la mayoría de los casos los desafíos están relacionados con aspectos económicos, como el costo de la enzima. Con el fin de superar estos obstáculos se han propuesto diferentes estrategias como la modificación genética de enzimas existentes o el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados que mejoren la vida útil de las enzimas. Además de la búsqueda de nuevas enzimas con propiedades novedosas que se adapten a los procesos ya existentes.

# Objetivos

---



## Objetivos generales:

- Fomentar el uso de la biocatálisis como alternativa verde a procesos químicos tradicionales.
- Estudiar y caracterizar las lipasas presentes en la cepa de *Janibacter* R02 aislada de muestras de la Antártida.
- Desarrollar preparaciones de lipasas con propiedades adecuadas que viabilicen su aplicación como catalizadores industriales.

## Objetivos específicos:

- Identificar, caracterizar y producir la o las enzimas responsables de la síntesis de biodiesel en el extracto crudo de *Janibacter* R02. (Capítulo 1)
- Purificar y caracterizar la enzima Lip J2 obtenida como cuerpos de inclusión a partir del sistema de expresión desarrollado en *E. coli*. (Capítulo 2)
- Obtener derivados inmovilizados de la lipasa de *Aspergillus niger*, que presenten características adecuadas para ser aplicados a la síntesis de biodiesel. (Capítulo 3)
- Desarrollar derivados inmovilizados de la lipasa BTL 2 sobre nanopartículas de óxido de hierro, para su aplicación a ensayos de hipertermia magnética. (Capítulo 4)
- Estudiar la capacidad catalítica de la arginina sobre el sustrato modelo pNP butirato. (Capítulo 5)



# Capítulo 1

---



# Capítulo 1: Purificación e identificación de lipasas de *Janibacter R02*

## 1.1. Introducción al capítulo

### 1.1.1. Búsqueda de nuevas lipasas

Debido a la relevancia que adquirieron a nivel industrial tanto en la variedad de reacciones en las que se aplican como en los beneficios económicos que se obtienen por su utilización como herramienta biocatalítica, y los beneficios para el medio ambiente que su utilización significa, la búsqueda de nuevas lipasas es un foco de atención para los diferentes actores involucrados en la biocatálisis.

Las lipasas son un grupo de enzimas ubicuas producidas por animales, plantas y microorganismos (Melani et al., 2020; Sarmah et al., 2018; Zheng, 2018). Si bien las primeras dos fuentes de lipasas han provisto a la industria de ejemplares sumamente útiles como la lipasa pancreática porcina utilizada industrialmente para la producción de emulsionantes y antifúngicos (Borrelli & Trono, 2015; Y. J. Zhou, Hu, Wang, Zhang, & Yu, 2013), la lipasa de *Avena sativa* la cual tiene un rol importante en la defensa contra patógenos en cereales (Jung & Moon, 2013) o *Jatropha curcas* la cual presenta gran actividad y estereoselectividad en reacciones de alcoholisis (Nanssou Kouteu, Baréa, Barouh, Blin, & Villeneuve, 2016); las lipasas de origen microbiano presentan la ventaja que su producción a partir del microorganismo nativo puede realizarse en medios de cultivo menos costoso, y su crecimiento no depende de factores estacionales (Borrelli & Trono, 2015).

El desarrollo de un biocatalizador adecuado para una aplicación dada puede basarse en diferentes aproximaciones. Por un lado, se pueden generar variantes de las enzimas ya conocidas, mediante evolución dirigida, o se puede explorar la biodiversidad existente de microorganismos cultivables o no cultivables, incluyendo el estudio de metagenomas. Una opción muy atractiva es ampliar la diversidad de microorganismos (y sus enzimas) que conocemos incluyendo aquellos de hábitats poco explorados (Akanuma et al., 2019; Arnold, 1998; Bassegoda, Cesarini, & Diaz, 2012; Christopher, Hemanathan Kumar, & Zambare, 2014; Dalmaso, Ferreira, & Vermelho, 2015; Joseph,

Ramteke, & Thomas, 2008; Kumar, Goomber, & Kaur, 2019; X. J. Li, Zheng, Ma, & Zheng, 2014; Luetz, Giver, & Lalonde, 2008; Reetz, 2016a; S. Sharma, Vaid, Bhat, Singh, & Bajaj, 2019; R. K. Singh, Tiwari, Singh, & Lee, 2013; Steele, Jaeger, Daniel, & Streit, 2008; Z. Sun, Liu, Qu, Feng, & Reetz, 2019). Dado que se conoce una parte ínfima de la población microbiana existente, en particular resulta muy interesante la prospección de enzimas de microorganismos extremófilos, ya que se ha observado que las enzimas de estos presentan características de actividad y estabilidad en condiciones ambientales adversas (De Simone et al., 2001; Eichler & Adams, 2005; Joseph et al., 2008; Leung et al., 2010; P. Y. Li et al., 2020; Mahyon, Zulkifli, Kamal, Salleh, & Oslan, 2018; Moura et al., 2017; Nurul Furqan & Akhmaloka, 2020; O. Olsen & Thomsen, 1991; Panizza, Syfantou, Pastor, Rodríguez, & Díaz, 2013; Thapa et al., 2019; Tyndall, Sinchaikul, Fothergill-Gilmore, Taylor, & Walkinshaw, 2002; H. Yang, Li, Du, & Liu, 2017; X. X. Zhou, Wang, Pan, & Li, 2008). Bajo esta consigna y teniendo el foco puesto en la síntesis enzimática de biodiesel, nuestro grupo de trabajo realizó una búsqueda de microorganismos en muestras de suelo de la Antártida, y a estos se les realizó una prospección en busca de lipasas extracelulares. Entre las cepas aisladas que presentaron actividad lipasa extracelular se seleccionó una, la cual fue identificada como *Janibacter* R02, cuyo crudo extracelular presentó buena *performance* para la producción de biodiesel.

### 1.1.2. Producción de lipasas microbianas

La producción de lipasas microbianas se puede llevar a cabo mediante dos estrategias, producción homóloga o heteróloga, donde ambas estrategias han demostrado ser exitosas a lo largo del tiempo. Sin bien la producción de enzimas a partir de los microorganismos silvestres suele ser ineficiente y requiere del desarrollo de protocolos de purificación que generalmente son tediosos, existen múltiples casos donde la producción de la proteína de interés sí es suficientemente eficiente para que sea el método elegido a nivel industrial. Entre estos microorganismos se encuentran algunos de los productores de las enzimas más utilizadas: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Sataphylococcus sp.*, *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Candida rugosa* (Daoud et al., 2013; Dror et al., 2015;

Fatima, Faryad, Ataa, Joyia, & Parvaiz, 2021; Gowthami, Muthukumar, & Velan, 2015; Oliveira et al., 2016; Pandey, Dhakar, Jain, & Pandey, 2016; Rajendran, Thirugnanam, & Thangavelu, 2007; Riyadi, Alam, Salleh, & Salleh, 2017; Sangeetha, Geetha, & Arulpandi, 2010; Suci, Arbianti, & Hermansyah, 2018).

Entre las estrategias utilizadas para la producción de estas enzimas se han ensayado diferentes metodologías de cultivo como ser fermentación en medio líquido (FML), fermentación en medio sólido (FMS), o producción en medio líquido a partir de células inmovilizadas (CIN). FML y FMS son por lejos las estrategias más utilizadas para la producción de lipasas a partir de microorganismos silvestres. FML consiste en el cultivo del microorganismo en un medio líquido conteniendo los nutrientes necesarios para su crecimiento y para promover la producción de la enzima de interés, la principal ventaja de esta técnica reside en que se logra homogeneidad del cultivo y es fácil de manipular. Dado que la mayoría de las lipasas se produce en forma extracelular basta con centrifugar los cultivos para recuperar el sobrenadante para la posterior purificación de la enzima. Por su parte FMS consiste en el cultivo del microorganismo (hongos filamentosos generalmente) sobre un sustrato sólido con baja humedad. Es una estrategia utilizada para cultivar microorganismos a partir de residuos industriales como cáscara de cereales o desechos de la industria forestal, y si bien se logran buenos rendimientos, el tratamiento final de los cultivos para la obtención de la enzima producida es muy trabajoso debido a los elevados volúmenes de medio que deben ser utilizados. Por último, CIN consiste en confinar en el espacio las células del microorganismo productor para protegerlo de condiciones de estrés del medio de cultivo, la principal ventaja de este método es que se pueden reutilizar las células para realizar producción continua de la enzima mediante el recambio del medio de cultivo. Sin embargo, su aplicación no está extendida debido a la dificultad en el desarrollo de las células confinadas (Fatima et al., 2021; Melani et al., 2020; Sarmah et al., 2018).

En algunos casos se encuentran enzimas que, si bien tienen características deseables para ser aplicadas en cierto proceso, su producción homóloga es una limitante para su aplicación, porque el microorganismo silvestre crece muy lento y no soporta procesos de intensificación, la tasa de producción de la proteína es muy baja o el cultivo del microorganismo es excesivamente costoso o dificultoso. En esos casos la expresión heteróloga de proteínas puede ser una solución. De forma simplificada, el éxito de la

expresión heteróloga de una enzima se resume en tres pasos: i) el clonado del gen de interés en un vector que contenga un marcador de selección adecuado, ii) transformar una cepa del organismo hospedero, con el vector desarrollado, y iii) expresar el gen de interés bajo el control de un promotor constitutivo o inducible y un terminador. Sin embargo, esto es solamente una simplificación, cuanto mayor es la información conocida sobre la proteína que se desea expresar mayores son las chances de éxito en el desarrollo de un sistema heterólogo de expresión.

En términos generales los sistemas de expresión heteróloga se dividen en los basados en organismos procariotas (bacterias) y en organismos eucariotas (levaduras, hongos filamentosos, plantas, animales). Dentro de los sistemas de expresión heteróloga utilizados industrialmente para la producción de lipasas *Escherichia coli* es el más utilizado (51%), seguido por *Pichia pastoris* (34 %), *Sacharomyces cereviseae* (7 %), *Aspergillus sp.* (3 %) y *Bacillus subtilis* (3 %), seguidos por otros géneros minoritarios. (Borrelli & Trono, 2015). La dominancia de *E. coli*, *P. pastoris* y *S. cereviseae*, se debe al conocimiento que se tiene sobre el metabolismo y el genoma de estos organismos (Contesini et al., 2020). Además, existen características intrínsecas de cada tipo de hospedero que los hacen más aptos para la expresión de una proteína en particular.

Los hospederos procariotas, suelen ser de fácil manipulación, existen diversas herramientas de clonado disponibles comercialmente (cepas, vectores, promotores, terminadores), presenta tiempos cortos de crecimiento y alcanzan grandes densidades celulares al ser cultivados en medios simples y de bajo costo. Sin embargo, presentan puntos negativos, no comparten la misma preferencia de codones que muchos organismos eucariotas, no son capaces de llevar a cabo modificaciones postraduccionales (fosforilación y glicosilación), son propensos a errores de plegamiento de las proteínas producidas incluyendo la formación de puentes de disulfuro. Frente a estas características, cuando no son requeridas las modificaciones postraduccionales de la proteína de interés, las cepas bacterianas constituyen los mejores sistemas de expresión heteróloga. Particularmente *E. coli* además presenta dificultades para la expresión de proteínas en forma extracelular, pese a todas estas desventajas es el género más utilizado para el desarrollo de sistemas de expresión heteróloga de lipasas. Esto se debe al vasto conocimiento documentado de su metabolismo, el gran número y variedad de cepas y las innumerables herramientas

moleculares con las que se cuenta para su modificación genética, muchas de las cuales están disponibles en forma comercial.

Los sistemas de expresión basados en células eucariotas (*Pichia pastoris* y *Sacharomyces cerevisiae*) por su parte, también tienen metabolismo conocido, se cuenta con herramientas moleculares para su manipulación y están disponibles comercialmente. Presentan asimismo ventajas adicionales exclusivas, como las modificaciones postraduccionales que son capaces de introducir sobre las proteínas expresadas (modificaciones proteolíticas, formación de puentes de disulfuro, glicosilaciones), lo que favorece la estabilidad y solubilidad de las proteínas. La purificación de la proteína de interés suele ser más sencilla debido a que permiten la secreción extracelular de la proteína expresada. El escalado del cultivo suele ser más sencillo lo que permite alcanzar niveles de producción de proteína mayores que los obtenidos con sistemas procariontes, y además existen sistemas aprobados por agencias reguladoras para su uso en la producción de proteínas de uso terapéutico (Borrelli & Trono, 2015; Cregg, 2007; Ghasemian & Moradpour, 2018; Mehta, Bodh, & Gupta, 2017; Robinson, Pringle, Woolhead, & Bulleid, 2017; H. Yang et al., 2017).

### 1.1.3. Purificación de lipasas microbianas

Independientemente de cuál sea la forma de producción de la lipasa de interés, para su aplicación en procesos controlados o para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados basados en ella, es necesario el desarrollo de protocolos de purificación, que permitan obtener la enzima en forma aislada, concentrada y activa. La purificación de proteínas generalmente no es un proceso universal, ni siquiera dentro de una familia de proteínas, y las lipasas no son la excepción, aunque si es posible aplicar diferentes técnicas clásicas para lograrlo, las cuales varían en función de las características de la lipasa. Cuando la enzima producida se encuentra en un volumen muy grande, como es el caso de la producción a partir de microorganismos silvestres, lo primero a realizar es un paso de concentración el cual puede llevarse a cabo mediante el agregado de algún agente que altere la solubilidad de las proteínas presentes (precipitación con agentes caotrópicos como sulfato de amonio, precipitación por agregado de solventes orgánicos, como acetona, etanol, isopropanol), sin afectar las propiedades biológicas de la

proteína. Estas técnicas no son específicas para la precipitación de lipasas pero son muy útiles a la hora de reducir el volumen de la solución de trabajo, obteniéndose resultados exitosos (Angajala, Pavan, & Subashini, 2016; Ayaz, Ugur, & Boran, 2015; Reetz, 2016a; Toscano et al., 2013; Walsh, 2014). Otra alternativa para la concentración de la lipasa de interés son los procesos de filtración a presión a través de membranas porosas de tamaño controlado (ultrafiltración, filtración tangencial) (M. Li, Yang, Xu, & Wu, 2013; Sarkar, Yamasaki, Basak, Bera, & Bag, 2012). A continuación, se suelen utilizar técnicas que permitan remover los principales contaminantes e impurezas (otras proteínas, ácidos nucleicos, entre otros), de forma que se maximiza la relación entre la proteína/actividad de interés y las impurezas. Algunas de estas técnicas son la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), cromatografía de intercambio iónico, las cuales se basan en características químicas de la lipasa a purificar, como ser su interacción con ligandos hidrofóbicos inmovilizados en una matriz sólida porosa, o la interacción a través de las cargas de la proteína con ligandos cargados en una matriz sólida porosa, respectivamente. Nuevamente estas estrategias pueden ser utilizadas en conjunto con otras, pero también pueden ser el único paso de purificación dependiendo de las características del medio donde esté inmersa la lipasa objetivo (Kanmani, Kumaresan, & Aravind, 2015; Rivera-Pérez, del Toro, & García-Carreño, 2011; Y. Sun, Shi, Zhang, Zhao, & Liu, 2011; Trodler, Nieveler, Rusnak, Schmid, & Pleiss, 2008). La cromatografía de exclusión molecular por su parte se basa en la separación de solutos en función de su tamaño, mediante su pasaje a través de una matriz porosa, de tamaño controlado. Este tipo de cromatografías permite trabajar en condiciones en la cual la enzima de interés es estable, seleccionando el buffer adecuado, y además es un buen método para acoplar como paso posterior a métodos de concentración por agregado de agentes caotrópicos o solventes orgánicos ya que permite cambiar la fase líquida en la cual está la proteína (Ayaz et al., 2015; Y. Sun et al., 2011; Yong, Lim, Saleh, & Tey, 2016). En casos donde exista una diferencia de tamaño entre la proteína de interés y las impurezas, es posible seleccionar una matriz que permita la separación de estos, además del desalado de la muestra.

Lejos de ser un análisis exhaustivo de las técnicas disponibles para la purificación de proteínas a partir del medio extracelular de un cultivo. La aplicación de dichas técnicas está ampliamente distribuida ya que son aplicables a una gran variedad de proteínas y

su costo es bajo comparado con otras técnicas como la utilización de sistemas de dos fases acuosas, sistema de micelas reversas, sistema de dos fases acuosas con flotación por gases, o la purificación mediante cromatografía de bioafinidad (Mathiazakan et al., 2016; Nandini & Rastogi, 2009; Show et al., 2012).

En el caso de las lipasas producidas en forma heteróloga, la purificación puede ser más sencilla ya que existe la posibilidad de introducir etiquetas de afinidad por ciertos ligandos durante la etapa de clonado de la enzima, en el diseño y construcción del vector de expresión. El mecanismo por el cual se purifican proteínas mediante etiquetas de afinidad es relativamente sencillo, se incluye en la proteína una etiqueta que reconoce un ligando inmovilizado en una matriz sólida de manera que incubando el crudo de la expresión de proteínas con la matriz conteniendo el ligando adecuado, se adsorbe la proteína blanco, y se separa fácilmente del resto de las proteínas contaminantes. Existen una gran variedad de etiquetas de afinidad comúnmente utilizadas, con diferentes propiedades, que pueden utilizarse para etiquetar a la proteína de interés para su posterior purificación por cromatografía de afinidad, entre ellas se encuentran poli-Histidina, glutatión-S-Transferasa, proteína de unión a maltosa, péptido de unión a calmodulina, péptido-strep, péptido-S (Kimple, Brill, & Pasker, 2013; Masomian, Rahman, & Salleh, 2018; Yagmurov, Kozlov, & Pushkarev, 2017).

## 1.2. Objetivos del capítulo

### 1.2.1. Objetivo general

Identificar, caracterizar y producir la o las enzimas responsables de la síntesis de biodiesel en el extracto crudo de *Janibacter* R02.

### 1.2.2. Objetivos específicos

- Desarrollar protocolos de purificación para la/s enzima/s con actividad lipasa presentes en el sobrenadante de cultivo de *Janibacter* R02.
- Identificar la o las enzimas responsables de la actividad lipasa observada en el sobrenadante de cultivo de *Janibacter* R02.
- Desarrollar sistemas de expresión heteróloga, para la/s enzima/s identificadas.
- Realizar la caracterización bioquímica de la/s enzima/s purificada/s.

## 1.3. Materiales y métodos

### 1.3.1. Manejo de cepas

Se utilizaron técnicas microbiológicas estándar para el manejo de todas las cepas. La manipulación de las cepas se realizó siempre con técnica aséptica. Las cepas se conservaron a -70 °C en medio de cultivo suplementado con glicerol al 15 % (stock). Los precultivos se iniciaron a partir de colonias frescas, tomadas de un primer repique del stock a -70°C en placas de Petri con el medio LB agar para *Escherichia coli* y *Pseudomonas* sp., Rhodamina B aceite de oliva agar para *Janibacter* R02 (Kouker & Jaeger, 1987) e YPD agar para *Pichia pastoris* y *Sacharomyces cerevisiae*. Dichas placas fueron almacenadas a 4 °C, de allí se tomaron colonias frescas como inóculo para los cultivos en medio líquido. Los cultivos de *E. coli* y *Pseudomonas* sp. se incubaron a 37 °C, salvo los casos donde se indique lo contrario. Los cultivos de *Janibacter* sp, *S. cerevisiae* y *P. pastoris* fueron incubados a 28 °C.

### 1.3.2. Producción y purificación de lipasas de *Janibacter* R02

La cepa de *Janibacter* R02 se cultivó de la siguiente manera. Se inocularon 5mL de medio TSB (precultivo) con una colonia de *Janibacter* R02 de un cultivo fresco, se incubaron a

28 °C y 200 rpm durante 48 horas. Con 1 mL de precultivo se inocularon 100 mL de TSB e incubaron a 28 °C y 200 rpm, durante 48 horas. Los cultivos se centrifugaron a 4 °C y 6000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se fraccionó en dos alícuotas iguales, una de ellas se almacenó a -20 °C, mientras que la otra se liofilizó y almacenó a -20 °C. El pellet de células se descartó. Las dos fracciones de sobrenadante obtenidas se utilizaron para la purificación de la enzima.

#### 1.3.2.1 Ensayo de actividad con derivados de 4-nitrofenol (Lip J1)

Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en placa de ELISA a temperatura ambiente, se realizaron triplicados de cada ensayo; la mezcla reactiva se compuso de 190 µL de pNP butirato 0,5 mM en Tris-HCl 20 mM pH 8,0, y 10 µL de una dilución de la enzima a ensayar en buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,0, las medidas en placa de Elisa se realizaron en lector de placas Multiscan RC/MS/EX Thermo. Alternativamente se llevaron a cabo en espectrofotómetro Shimadzu UV-Vis 1800 donde la mezcla reactiva se compuso de 1,0 mL de pNP butirato 0,5 mM en Tris-HCl 20 mM pH 8,0, y 20 µL de una dilución de la enzima a ensayar en buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,0. En ambos casos se realizaron medidas cinéticas y se midió la liberación de pNP mediante medida de la absorbancia a 405 nm. Para el cálculo de la concentración se utilizó el coeficiente de absortividad molar del pNP a 405nm, a pH 8,0,  $1,48 \times 10^{-2} \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### 1.3.2.2 Ensayo de actividad cualitativo con derivados de metilumbeliferona (MUF)

Los ensayos de actividad cualitativos se llevaron a cabo incubando 5 µL de MUF-butirato con 5 µL de la muestra a analizar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se transfirió la totalidad de la mezcla a una hoja de papel de filtro, se dejó secar y se expuso a luz UV. Cada muestra revelada mediante este método fue comparada con un control positivo y uno negativo en la misma hoja.

### 1.3.2.3 Purificación de Lip J1 a partir del sobrenadante de cultivo de *Janibacter* R02

#### 1.3.2.3.1 Fraccionamiento salino

A partir del sobrenadante de cultivo de *Janibacter* R02, se realizó un fraccionamiento mediante el agregado de sulfato de amonio a saturaciones entre 10 y 90 % (a intervalos periódicos de 10 %). Dicho agregado se realizó en forma paulatina, en baño de hielo y con agitación magnética constante. Luego de alcanzar el porcentaje de saturación deseado, se incubó a 4 °C durante 18 horas sin agitación. Se centrifugó la muestra a 4 °C y 8000 rpm durante 10 minutos, se separó el sobrenadante. En todos los casos el precipitado obtenido fue disuelto en buffer fosfato de sodio y potasio 50 mM pH 7,0, y se evaluó la actividad frente a pNP butirato de ambas fracciones (precipitado disuelto y sobrenadante de la precipitación). El sobrenadante de la precipitación al 90 % de saturación de sulfato de amonio fue concentrado en centrífuga Vivaspín® 10kDa a 4 °C y 8000 rpm durante intervalos de 25 minutos, hasta que el volumen se redujo a la décima parte. La presencia de sodio y potasio en el buffer responde a observaciones previas de nuestro grupo donde se demostró que la adición de dichos metales al sobrenadante de cultivo de *Janibacter* R02, provoca un aumento de la actividad de la/s lipasas allí presentes.

#### 1.3.2.3.2 Fraccionamiento mediante el agregado de acetona

A partir del sobrenadante de cultivo de *Janibacter* R02, se realizó un fraccionamiento mediante el agregado de acetona fría en un rango entre 10 y 50 % en volumen (a intervalos periódicos de 10 %), el mismo se realizó gota a gota, en baño de hielo con agitación magnética constante. Luego de alcanzar el porcentaje deseado se incubó a 4 °C durante 2 horas sin agitación. Se centrifugó la muestra a 4 °C y 8000 rpm durante 10 minutos, se separó el sobrenadante. El precipitado (PA) fue disuelto en buffer fosfato de sodio y potasio 50 mM pH 7,0, se evaluó la actividad frente a pNP butirato de ambas fracciones.

#### 1.3.2.3.3 Purificación por cromatografía de exclusión molecular

Se realizó una cromatografía de exclusión molecular en un ÄKTA Purifier, GE Healthcare dotado con una columna Superdex 75 10/300. Las muestras inyectadas fueron: i) 1mL de sobrenadante del medio de cultivo de *Janibacter* R02 liofilizado, disuelto en buffer

fosfato de sodio y potasio 50 mM pH 7,0; ii) 1 mL del precipitado a 50 % v/v de acetona, disuelto en buffer fosfato de sodio y potasio 50 mM pH 7,0. La cromatografía se llevó a cabo en buffer fosfato de sodio y potasio 50 mM pH 7,0; a un flujo de 0,3 mL/min a temperatura ambiente y se recolectaron fracciones de 0,5 mL a las cuales se les realizó un ensayo de actividad cualitativo utilizando MUF butirato como sustrato. Las fracciones que presentaron actividad fueron liofilizadas para su posterior análisis mediante electroforesis.

#### 1.3.2.3.4 Purificación por cromatografía de intercambio iónico

El precipitado con 50 % de acetona se disolvió en buffer acetato de sodio 50 mM pH 5,0 y se le realizó una cromatografía de intercambio iónico en un ÄKTA Purifier dotado de una columna MonoQ 10/100 GL. Se aplicaron 5,0 mL de muestra a un flujo de 0,3 mL/min, se descartó la proteína no unida mediante el lavado con 3 volúmenes de columna de buffer acetato de sodio 50mM pH 5,0. La elución se realizó por aumento de la fuerza iónica mediante el agregado de buffer acetato de sodio 50 mM pH 5,0 con una concentración creciente de NaCl (0 a 1 M). El proceso se monitoreó mediante la medida de absorbancia a 280 nm, se recogieron fracciones de 0,5 mL a las cuales se les realizó el ensayo de actividad cualitativo explicado en 1.3.2.2. Las fracciones que presentaron actividad fueron liofilizadas para su posterior análisis mediante electroforesis.

#### 1.3.2.4 Definición de unidad de enzima para la lipasa Lip J1 de *Janibacter* R02

Cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol (pNP) por minuto a pH 7,0 y temperatura ambiente.

#### 1.3.2.5 Estudio del efecto del pH sobre la actividad enzimática

Se evaluó la actividad enzimática siguiendo el procedimiento descrito en 1.3.2.1, sustituyendo el buffer allí indicado por buffer ATB (ácido acético 50 mM, Tris-HCl 50 mM, ácido bórico 50 mM) al pH indicado en cada caso, utilizando el coeficiente de absorptividad del pNP correspondiente para cada pH.

#### 1.3.2.6 Estudio de la estabilidad frente al pH

La estabilidad frente al pH se llevó a cabo incubando la enzima (26 UE) en buffer ATB al pH a evaluar durante 24 horas a 4 °C. Luego de la incubación se realizó la medición de la actividad en las condiciones descritas en 1.3.2.1.

#### 1.3.2.7 Estudio de la estabilidad frente a la temperatura

La estabilidad frente a la temperatura se llevó a cabo incubando a diferentes temperaturas la enzima en buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,0 durante 1 hora, posteriormente se midió la actividad remanente según lo descrito en 1.3.2.1.

#### 1.3.2.8 Ensayo de hidrólisis de trioleína

Para evaluar la hidrólisis de trioleína se establece una mezcla de reacción compuesta por 185 µL de buffer fosfato de sodio y potasio 50 mM, pH 7,0; 5 µL de aceite de oliva marca COUSA (aproximadamente 75 % de trioleína) y 10 µL de la alícuota de enzima a ensayar. Se incubó a 37 °C y 150 rpm durante 24 horas, pasado ese tiempo se realizó una extracción mediante el agregado de 200 µL de acetato de etilo. Se centrifugó la muestra y se removió cuidadosamente el sobrenadante (capa orgánica), se removieron las trazas de agua mediante la adición de una punta de espátula de sulfato de sodio anhidro, y se conservó para su posterior análisis.

#### 1.3.2.9 Cromatografía gaseosa

El análisis cuantitativo de la síntesis de biodiesel se llevó a cabo por cromatografía gaseosa en un cromatógrafo Shimadzu GC 2014 dotado de una columna DB-5HT y FID. Las condiciones operativas fueron: carrier hidrógeno, temperatura del inyector: 230 °C, temperatura del detector: 250 °C. presión 39 kPa, flujo 27,3 mL/min, flujo en la columna 0,48 mL/min, inyección Split (1:50). Se empleó el siguiente programa de temperatura: temperatura inicial 60 °C, incremento de 15 °C /minuto hasta 190 °C, incremento de 7 °C /min hasta 230 °C, incremento de 30 °C /min hasta 380 °C y permanencia a esa temperatura durante 10 minutos. Alternativamente se utilizó un cromatógrafo Agilent Technologies 7820<sup>a</sup> GC dotado con una columna DB-225 y FID. Las condiciones operativas fueron: carrier N<sub>2</sub> 0,2 mL/min y la temperatura del inyector y detector fue

250 °C. Se empleó el siguiente programa de temperatura: temperatura inicial 40 °C durante 0,5 minutos, incremento de 25 °C/minuto hasta 195 °C, incremento de 3 °C/min hasta 205 °C, incremento de 8 °C/min hasta 230 °C y permanencia a esa temperatura durante 10 minutos.

#### 1.3.2.10 Cromatografía en capa fina (TLC)

La evaluación cualitativa de los ensayos de hidrólisis de trioleína se realizó por TLC. Las muestras para analizar fueron sembradas en una placa de sílica gel (Silica Gel TLC plates alugram SIL G/UV 254) de 7 cm de largo y se desarrolló la cromatografía utilizando como fase móvil una mezcla de hexano/éter etílico/ácido acético en relación 80:20:1 (v/v/v). El revelado se realizó en cámara de iodo. En cada corrida se incluyó un estándar de resolución, compuesto por biodiesel 100 (dil 1/150):ácido oleico 10 mM:aceite de oliva (dil 1/120), todas las diluciones fueron realizadas en hexano, la concentración del ácido y el aceite son las mismas que en la mezcla de reacción utilizada y la concentración de biodiesel es la esperada para una conversión del 100%.

1.3.2.11 Identificación de genes codificantes para lipasas a partir de ADN genómico de *Janibacter* R02 y construcción de sistemas de expresión heteróloga

1.3.2.11.1 Cepas utilizadas

En la Tabla 1.1 se listan las cepas utilizadas para la mantención, propagación de material genético y la expresión heteróloga de proteína, y sus principales características.

Tabla 1.1. Cepas utilizadas en el presente trabajo

Cepa	Genotipo relevante	Proveedor/referencia
<i>E. coli</i> Top 10	F- $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ <i>mcrA</i> , $\phi 80lacZ\Delta M15$ , $\Delta lacX74$ , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu)7697$ , <i>galU</i> , <i>galK</i> $\lambda^-$ , <i>rpsL(Str<sup>R</sup>)</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Thermo Fisher
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	F' <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3) pRARE (Cam <sup>R</sup> )	Thermo Fisher
<i>E. coli</i> Roseta-Gami (DE3)	$\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA$ PvuII <i>phoR</i> <i>araD139</i> <i>ahpC</i> <i>galE</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (DE3) F'[ <i>lac<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> pro</i> ] <i>gor522::Tn10</i> <i>trxB</i> pRARE2 (Cam <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )	Thermo Fisher
<i>E. coli</i> BL21 DE3	F', <i>ompT</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lon</i> , <i>hsdSB(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>)</i> , $\lambda$ (DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i> ]), [ <i>malB<sup>+</sup></i> ] <sub>K-12</sub> ( $\lambda$ S)	Thermo Fisher
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F- $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169$ <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17(rK<sup>-</sup>, mK<sup>+</sup>)</i> <i>phoA</i> <i>supE44</i> $\lambda^{-}$ <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>	Thermo Fisher
<i>PichiaPink</i> <sup>TM</sup> cepa 1	<i>ade2</i>	Invitrogen
<i>PichiaPink</i> <sup>TM</sup> cepa 2	<i>ade2</i> , <i>pep4</i>	Invitrogen
<i>PichiaPink</i> <sup>TM</sup> cepa 3	<i>ade2</i> , <i>prb1</i>	Invitrogen
<i>PichiaPink</i> <sup>TM</sup> cepa 4	<i>ade2</i> , <i>prb1</i> , <i>pep4</i>	Invitrogen
<i>Pichia pastoris</i> GS115	<i>his4</i>	Invitrogen
<i>Pichia pastoris</i> X-33	Wild type	Invitrogen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO 1 $\Delta lipH$ PW5805	<i>lipH</i> (PA2863)-CO1::ISphoA/hah	(Panizza Scasso, 2013)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	<i>rmo-</i> <i>mod-</i>	(Regenhardt et al., 2002)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPH 499	<i>ura3-52</i> , <i>lys2-801_amber</i> , <i>ade2-101-ochre</i> , <i>trp1-<math>\Delta</math>63</i> , <i>his3-<math>\Delta</math>200</i> , <i>leu2-<math>\Delta</math>1</i>	(Sikorski & Hieter, 1989)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 15C	MATa, <i>leu2</i> , <i>ura3-52</i> , $\Delta$ <i>trp1</i> , <i>his4-80</i> , <i>pep4-3</i>	Provided by Andrew Buchman

En la Tabla 1.2 se listan los plásmidos utilizados para el clonado de los genes de interés o pasos intermedios de las construcciones necesarias para el desarrollo de los sistemas de expresión, y sus características más relevantes.

Tabla 1.2. Vectores utilizados en el presente trabajo

Plásmido	Características más relevantes	Proveedor/referencia
pET-22b(+)	Promotor T7, <i>lacI</i> , secuencia HisTag, <i>Amp<sup>R</sup></i>	Novagen
pUC 57	<i>lacZ</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i> ,	("pUC57 plasmid DNA - GenScript," n.d.)
pGemT	<i>lacZ</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	Promega Corp.
pESC-URA	Promotores divergentes <i>gal 1 / gal 10</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i> , marcador de selección <i>URA3</i>	Agilent Technologies
pPINK $\alpha$ HC	Promotor <i>ADE2</i> , promotor <i>AOX1</i> , $\alpha$ factor secretion signal sequence	Invitrogen
pPICZ $\alpha\alpha$	Promotor <i>AOX1</i> , $\alpha$ factor secretion signal sequence, secuencia HisTag, <i>Zeo<sup>R</sup></i>	Invitrogen
pGAPZ $\alpha\alpha$	Promotor <i>GAP</i> , $\alpha$ factor secretion signal sequence, secuencia HisTag, <i>Zeo<sup>R</sup></i>	Invitrogen
pBBR1MCS	<i>lacZ</i> , <i>Cm<sup>R</sup></i>	(Kovach et al., 1995)

### 1.3.2.12 Cebadores utilizados

En la Tabla 1.3 se listan los cebadores diseñados para el clonado y subclonado del gen de Lip J2, en los diferentes sistemas de expresión que se desarrollaron durante este trabajo.

Tabla 1.3. Cebadores utilizados en el presente trabajo

Cebador	Secuencia
fw 14A	GACCATATGATGACCTCCATGACCAAACGC
rv 14B	CACAAGCTTTCACAGACGCCAGCAGGAGTT
fw 96A	ACAAAGAGAGAGGCAACAGCATGACATCAATGAAAACG
rv 96B	CGATCACGATCCCCTCGGCAGCCCTGAAAATACAGGTTTCAGACGCCAGCAGCAGGTT
fw 70A	TCAAGGCCTACCTCCATGACCAAGCG
rv 170B	ACTGGTACCTCACAGACGCCAGCAGGAGTT
fw 175F	GACGAATTCATCATCATCATCATCATGATCATAGAGATGTTCCAGGAACTC
rv 175G	CTCGCGGCCGCCTAAAGTCTCCAACAACCTATTGACC
fw 175C	CGAGAATTCATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCTGCATCCTCCGCATTAGC
rv 175D	GAGTTCCTGGAACATCTATGATCGTGGTGATGATGGTGATGAGCTAATGCGGAGGATGCAGC

En la Tabla 1.4 se muestran los sistemas de clonado y expresión desarrollados en este trabajo, detallando la cepa base y el vector desarrollado para la ocasión.

Tabla 1.4. Cepas recombinantes construidas en el presente trabajo

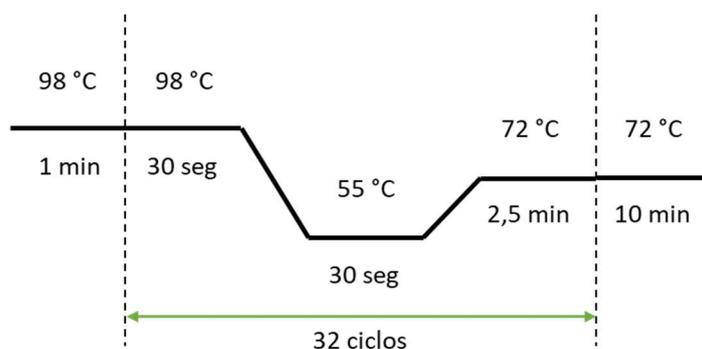
Cepa recombinante	Cepa base	Vector
AC I	<i>E. coli</i> Top10	pET 22b + Lip J2 s/o
AC II	<i>E. coli</i> Top10	pET 22b + Lip J2 oc
AC III	<i>E. coli</i> BL 21 (DE3)	pET 22b + Lip J2 s/o
AC IV	<i>E. coli</i> BL 21 (DE3)	pET 22b + Lip J2 oc
AC V	<i>E. coli</i> Rosetta-Gami	pET 22b + Lip J2 oc
AC VI	<i>E. coli</i> Shuffle	pET 22b + Lip J2 oc
AC VII	<i>E. coli</i> Top10	pUC 57 + Lip J2 os
AC VIII	<i>E. coli</i> Top10	pPINK $\alpha$ HC + Lip J2 os
AC IX	PichiaPink™ cepa 1	pPINK $\alpha$ HC + Lip J2 os
AC X	PichiaPink™ cepa 2	pPINK $\alpha$ HC + Lip J2 os
AC XI	PichiaPink™ cepa 3	pPINK $\alpha$ HC + Lip J2 os
AC XII	PichiaPink™ cepa 4	pPINK $\alpha$ HC + Lip J2 os
AC XIII	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	pPicZ $\alpha$ A
AC XIV	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	pPicZ $\alpha$ A
AC XV	<i>P. pastoris</i> GS115	pPICZ $\alpha$ HC + Lip J2 os
AC XVI	<i>P. pastoris</i> GS115	pGAP $\alpha$ HC + Lip J2 os
AC XVII	<i>P. pastoris</i> X-33	pPICZ $\alpha$ HC + Lip J2 os
AC XVIII	<i>P. pastoris</i> X-33	pGAP $\alpha$ HC + Lip J2 os
AC XIX	<i>E. coli</i> Top10	pBBR1MCS + LARD + TEV + Lip J2 oc
AC XX	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 $\Delta$ lipH	pBBR1MCS + LARD + TEV + Lip J2 oc
AC XXI	<i>P. pútida</i> KT2440	pBBR1MCS + LARD + TEV + Lip J2 oc
AC XXII	<i>E. coli</i> Top10	pESC URA + $\alpha$ minimal signal + Lip J2
AC XXIII	<i>S. cerevisiae</i> YPH499	pESC URA + $\alpha$ minimal signal + Lip J2
AC XXIV	<i>S. cerevisiae</i> 15C	pESC URA + $\alpha$ minimal signal + Lip J2
AC XXV	<i>E. coli</i> BL 21 (DE3)	pBTL1 + BTL 2 wt
AC XXVI	<i>E. coli</i> BL 21 (DE3)	pBTL1 + BTL 2 (S333C)
AC XXVII	<i>E. coli</i> BL 21 (DE3)	pBTL1 + BTL 2 (T93C)

s/o, refiere al gen de Lip J2 amplificado a partir del ADN genómico de *Janibacter* R02

oc, refiere al gen de Lip J2 optimizado para la expresión en *Escherichia coli* sintetizado por la firma Genscript.

os, refiere al gen de Lip J2 optimizado para la expresión en *Sacharomyces cerevisiae* sintetizado por la firma Genscript.

Para la construcción de los vectores se amplificó el gen de Lip J2 utilizando el par de cebadores indicados en cada caso, de acuerdo al programa de PCR mostrado en la *Figura 1.1*. La inserción del amplicón en los plásmidos se llevó a cabo mediante el uso de enzimas de restricción de corte cohesivo, excepto el caso del sistema desarrollado para



*Figura 1.1.* Ciclo de PCR utilizado para la amplificación del gen codificante para Lip J2.

la expresión en *Pseudomonas sp* donde la construcción se llevó a cabo mediante clonado libre de enzimas de restricción (Van Den Ent & Löwe, 2006).

### 1.3.3. Ensayos de expresión de Lip J2

#### 1.3.3.1 Expresión en cepas de *Escherichia coli*

Se inocularon 5 mL de medio LB ampicilina (precultivo) con una colonia fresca de las cepas de *E. coli* conteniendo las construcciones necesarias para la expresión de Lip J2 y sus respectivos controles de expresión, se incubaron a 37 °C y 200 rpm ON. Con 1 mL de precultivo, se inocularon 100 mL de LB ampicilina y se incubaron a 37 °C y 200 rpm hasta OD600 = 0,5. Se indujo la expresión de proteína mediante el agregado de iso-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1mM, y se incubó a 20 °C y 200 rpm durante 24 hs. Pasado ese tiempo se centrifugó el cultivo a 4 °C y 8000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 2 mL de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,0 y se lisaron por ultrasonido aplicando pulsos de 3 segundos al 20% de amplitud, con 1 segundo de pausa entre pulsos, durante 25 segundos. Este proceso se realizó en baño de hielo y se repitió 4 veces. El lisado se centrifugó a 4 °C y 8000 rpm durante 10 minutos, se separó el sobrenadante (fracción

soluble) del pellet (fracción insoluble), este último se resuspendió en 2 mL de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,0, se conservaron ambas fracciones para su análisis mediante SDS-PAGE. Los controles de expresión consistieron en la cepa de utilizada para la expresión de Lip J2, transformada con el vector base de la construcción utilizada en cada caso sin el inserto del gen de Lip J2.

#### 1.3.3.2 Expresión en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 $\Delta$ lipH

Se inocularon 5 mL de medio LB cloranfenicol y tetraciclina (precultivo) con una colonia fresca de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ lipH conteniendo la construcción necesaria para la expresión de Lip J2 y su respectivo control de expresión, se incubaron a 30 °C y 200 rpm ON. Con 1 mL de precultivo, se inocularon 100 mL de LB cloranfenicol y tetraciclina, se incubaron a 30 °C y 200 rpm hasta OD600 = 0,5. Se indujo la expresión de proteína mediante el agregado de IPTG a una concentración final de 1mM, se incubó a 20 °C y 200 rpm durante 24 horas. Pasado ese tiempo se centrifugó el cultivo a 4 °C y 8000 rpm durante 10 minutos, se separó el sobrenadante del pellet de células. Se concentró el sobrenadante mediante ultrafiltración utilizando filtros concentradores Vivaspin 20 de corte 25 kDa, a 4 °C y 8000 rpm el tiempo necesario para lograr concentrarlo 20 veces. Las células se resuspendieron en 2 mL de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,0 y se lisaron por ultrasonido aplicando pulsos de 3 segundos al 20% de amplitud, con 1 segundo de pausa entre pulsos, durante 25 segundos. Este proceso se realizó en baño de hielo y se repitió 4 veces. El lisado se centrifugó a 4 °C y 8000 rpm durante 10 minutos, se separó el sobrenadante (fracción soluble) del pellet (fracción insoluble), este último se resuspendió en 2 mL de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,0. Todas las fracciones se conservaron a -20 °C para su análisis mediante PAGE-SDS.

#### 1.3.3.3 Expresión en cepas de levaduras

Los ensayos de expresión para las cepas de *P. pastoris* 1, 2, 3 y 4 del sistema PichiaPinkTM, GS 115 y X-33, se realizaron según lo recomendado por el fabricante en el manual de uso. (Invitrogen, 2010a, 2010b, 2014).

Los ensayos de expresión para las cepas de *S. cerevisiae* YPH499 y 15C se realizaron según lo recomendado por el fabricante en el manual de uso (Technologies, 2011).

#### 1.3.3.4 Ensayo de retención de plásmido

Se partió de una colonia fresca de las cepas AC XXIII y AC XXIV (Tabla 1.4), a partir de ellas se realizó un pre inóculo en medio YPD, se incubó toda la noche. A partir del pre cultivo, se inocularon 25 mL de medio YPD y SD, se incubaron a 28 °C durante 24 horas, pasado ese tiempo se midió el crecimiento mediante densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ). En paralelo se sembraron diluciones seriadas de ambos cultivos, en medio YPD agar y SD agar suplementado de acuerdo con la selección por auxotrofia correspondiente. Se incubaron a 28 °C durante 48 horas, posteriormente se realizó el recuento de las colonias presentes en ambos medios.

## 1.4. Resultados y discusión

Como fue mencionado anteriormente se trabajó a partir de un aislamiento realizado a partir de una muestra de suelo de la Antártida, el cual fue identificado como *Janibacter* R02 y cuyo crudo extracelular presentó buena *performance* para la producción de biodiesel.

### 1.4.1. Cultivo de *Janibacter* R02

A fin de caracterizar la producción de lipasa extracelular en la cepa *Janibacter* R02, se llevó a cabo el estudio de la actividad enzimática en función de la curva de crecimiento

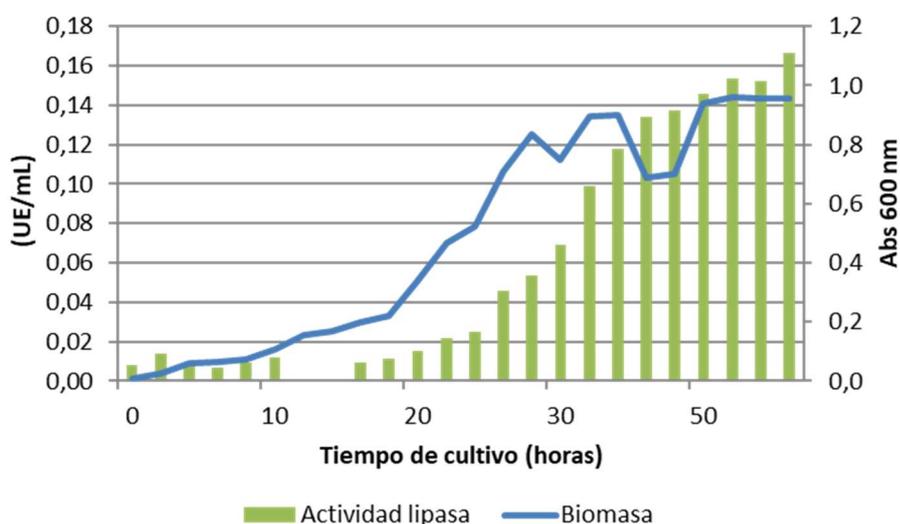


Figura 1.2. Curva de crecimiento de *Janibacter* R02 y producción de actividad lipasa en el sobrenadante de cultivo medida mediante el ensayo cuantitativo utilizando pNP Butirato como sustrato.

durante 56 horas. Como se observa en la *Figura 1.2* el cultivo entró en fase estacionaria a las 32 horas, mientras que la actividad lipasa presente en el sobrenadante de cultivo aumentó en forma exponencial a partir de las 26 horas alcanzando su máximo luego de las 40 horas y manteniéndose constante hasta el final del ensayo. Esto podría indicar que la actividad enzimática que queremos aislar no es constitutiva, sino que es inducible, probablemente obedeciendo la ausencia de glucosa en el medio. Frente a los resultados obtenidos se decidió llevar a cabo los siguientes cultivos durante 42 horas.

#### 1.4.2. Purificación de enzimas a partir del sobrenadante de cultivo de *Janibacter*

##### R02

Dado el gran volumen de muestra y la escasa cantidad de proteína de interés de la que se parte, el primer paso que se planteó fue concentrar las proteínas presentes en el sobrenadante de cultivo de *Janibacter* R02. Para ello se llevó a cabo un fraccionamiento salino por adición de sulfato de amonio en un amplio rango de saturación (0 a 90% p/v). Finalmente, se le ensayó actividad a cada una de las fracciones frente a pNP butirato donde se constató que ninguno de los precipitados evaluados presentaba actividad lipasa. Se comprobó que la actividad de interés aún se encontraba presente en el sobrenadante 90% de saturación de sulfato de amonio, por lo que se procedió a concentrar las proteínas presentes mediante ultrafiltración por centrifugación utilizando un dispositivo concentrador de corte 10 kDa. Este proceso resultó ser tedioso debido al pequeño volumen de muestra que se puede aplicar cada vez (2 mL aproximadamente), adicionalmente al reducir el volumen a la décima parte se produjo la pérdida total de la actividad presente en la muestra de partida. Se manejaron dos hipótesis sobre la pérdida de actividad, la primera plantea que durante el proceso de concentración algún compuesto de peso molecular menor a 10 kDa necesario para el desarrollo de la actividad catalítica, pasa a la fracción filtrada. Para comprobar esto, se mezclaron la fracción filtrada y la fracción concentrada, pero no se recuperó la actividad. La segunda hipótesis está relacionada al aumento de la concentración de proteínas en la fracción retenida por el filtro, formándose agregados proteicos favorecidos por el alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos, lo que podría bloquear el acceso del sustrato al sitio catalítico, y por ende resultar en la pérdida de actividad observada.

El fraccionamiento del sobrenadante de cultivo de *Janibacter* R02 por agregado de sulfato de amonio en un amplio rango de concentraciones no resultó ser una estrategia eficiente para la concentración de enzima de interés, lo que nos llevó a plantear otra estrategia.

Se exploró la precipitación de proteínas mediante el agregado de acetona en frío. Nuevamente se partió del sobrenadante de cultivo de *Janibacter* R02 y se comenzó estudiando el agregado de un 10% de acetona fría v/v. En la *Figura 1.3* se muestra el análisis mediante PAGE-SDS del perfil proteico de las diferentes fracciones del proceso

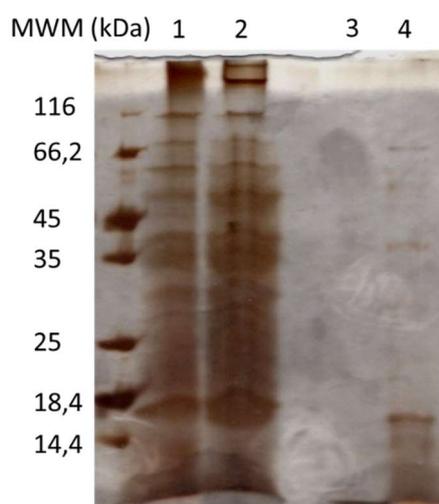


Figura 1.3. Evaluación del proceso de precipitación con acetona mediante PAGE-SDS. gel homogéneo 12,5%, revelado con técnica de plata. Carril 1, sobrenadante de cultivo de *Janibacter R02*, carril 2, precipitado con acetona al 50 %; carril 3, sobrenadante de la precipitación con acetona al 50 %; carril 4, precipitado con acetona al 10 %.

de precipitación con acetona. El carril 4 corresponde al precipitado obtenido cuando el agregado de acetona fue del 10 % v/v, si bien se observa la presencia de proteínas, esta fracción no mostró actividad cuando la misma fue evaluada cualitativamente utilizando MUF-butirato como sustrato. Sí se constató actividad enzimática presente en el sobrenadante correspondiente, por lo que se procedió a realizar la precipitación a concentraciones superiores de acetona; cuando el porcentaje de acetona aplicado fue de 50 % v/v la precipitación de proteínas fue casi total como se puede ver al comparar los carriles 2 (precipitado) y 3 (sobrenadante) de la *Figura 1.3*. En este caso el precipitado una vez disuelto en buffer fosfato de sodio y potasio 50 mM pH 7,0 mostró actividad frente a MUF-butirato, con una intensidad similar a la inicial, mientras que el sobrenadante mostró actividad, pero muy leve.

Con el objetivo de lograr la precipitación selectiva de las proteínas presentes en la muestra, se llevó a cabo la precipitación a porcentajes de acetona intermedias entre 10 y 50% v/v. Sin embargo, no se logró el resultado deseado a ningún porcentaje ensayado. Frente a estos resultados, se decidió trabajar con el precipitado obtenido mediante el agregado de 50 % v/v de acetona, ya que en esta condición se logró precipitar mayor cantidad de proteína y que mostraron la mayor actividad enzimática remanente, en comparación con las otras condiciones ensayadas.

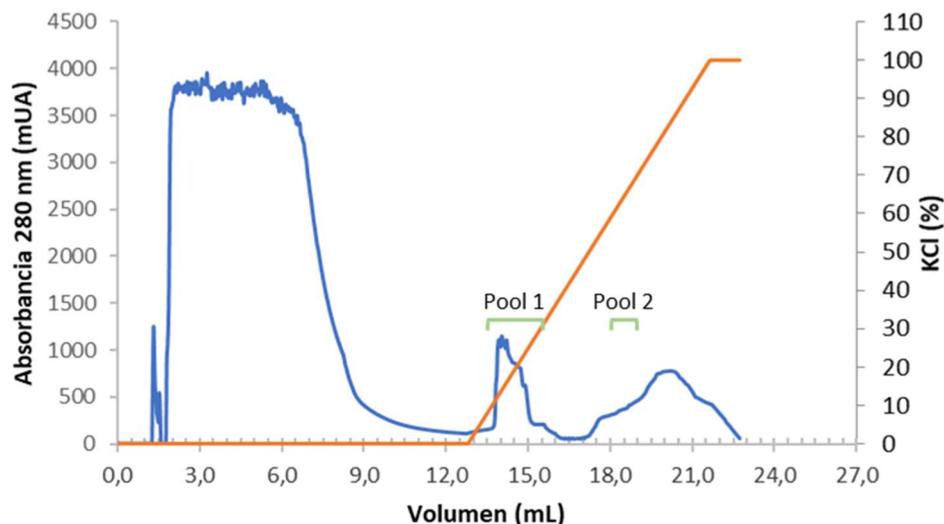


Figura 1.4. Cromatografía de intercambio iónico en columna HiTrap Q 5mL. En azul, curva de concentración de proteína estimada por absorbancia 280 nm (mUA), en naranja porcentaje de cloruro de potasio aplicado durante la cromatografía (100 % = 1 M)

Para la siguiente etapa de purificación se diseñó una estrategia de purificación mediante cromatografía de intercambio iónico. Se utilizó como muestra de partida el precipitado con acetona (PA) obtenido a partir de 100 mL de cultivo de *Janibacter* R02 el cual fue disuelto en 30 mL buffer acetato de sodio 50 mM, pH 5,0 y se ofrecieron 5,0 mL de dicha solución, a una columna de intercambio aniónico HiTrap Q 5 mL en las condiciones detalladas en 1.3.2.3.4. En la *Figura 1.4* se muestra el cromatograma del proceso de intercambio iónico, quedando en evidencia que la mayor parte de la proteína presente en la muestra de partida, no se adsorbe a la matriz al pH de trabajo. La elución se llevó a cabo mediante la aplicación de un gradiente de cloruro de potasio entre 0 y 1,0 M, y se recogieron fracciones de 0,5 mL durante todo el gradiente. Las fracciones del pool 1 eluyeron a concentraciones de cloruro de potasio entre 120 y 250 mM, mientras que las que constituyen el pool 2 lo hicieron a concentraciones entre 550 y 650 mM. A cada fracción recolectada se le realizó un ensayo de actividad cualitativo utilizando MUF-butirato como sustrato, y se constató que las fracciones incluidas en los pool 1 (fracciones 3 a 7) y 2 (fracciones 12 a 14) indicados en la *Figura 1.4* fueron las únicas que presentaron actividad lipasa (se considera fracción 1 la que eluye a partir de los 12,5mL). Las fracciones que mostraron actividad lipasa fueron evaluadas mediante PAGE-SDS. En la *Figura 1.5* se aprecia que las fracciones 3,4 y 5, correspondientes al pool 1, presentan dos bandas de proteína, una 45 kDa y otra de 20 kDa aproximadamente. Mientras que

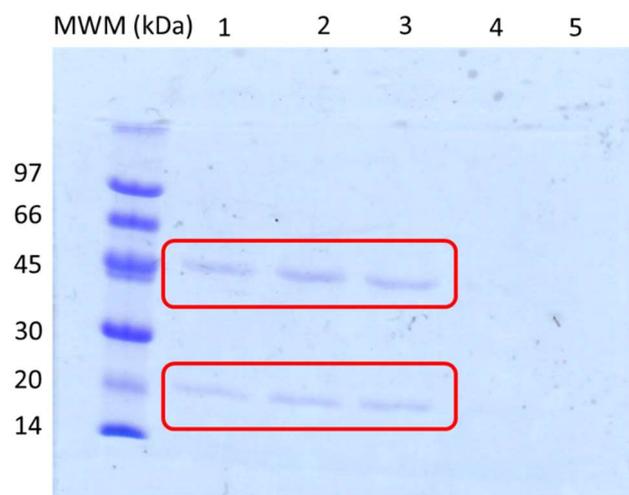


Figura 1.5. Evaluación del proceso de intercambio iónico realizado mediante PAGE-SDS en gel homogéneo 12,5% revelado con Coomassie. Carril 1 fracción 3, carril 2 fracción 4, carril 3 fracción 5, carril 4 fracción 13, carril 5 fracción 14.

las fracciones 13 y 14, incluidas en el pool 2, no presentaban concentración suficiente para poder visualizarlas mediante la técnica de tinción utilizada. Debido a que se trata de una electroforesis en condiciones desnaturalizantes, no se puede concluir sobre la cantidad de proteínas presentes en el pool 1, como mínimo se trataría de una proteína con dos subunidades de diferente peso molecular, o que haya sufrido proteólisis durante la etapa de cultivo, pero no se descarta la presencia de más de una proteína.

Se llevó a cabo un isoelectroenfoque en Phast System® utilizando un gel PhastGel® IEF Pre-cast 3 - 9 siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Bio-Sciences, 1995),

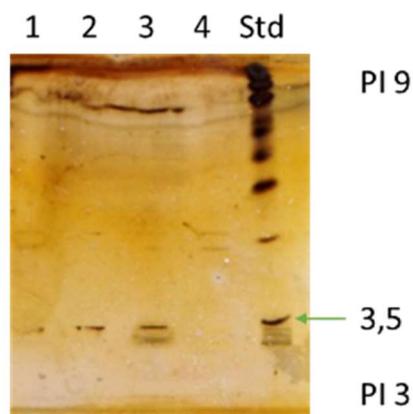


Figura 1.6. Isoelectroenfoque en gel PhastGel® IEF Pre-cast 3 – 9 y revelado mediante tinción con plata. Carril 1 fracción 3 diluida al cuarto, carril 2 fracción 3 diluida al medio, carril 3 fracción 3 sin diluir, carril 4 fracción 13 sin diluir, Std corresponde a Amersham Calibration Kits for pI Determinations using Isoelectric Focusing broad range 3 – 10.

donde se evaluó la fracción 3 ya que presentó mayor concentración de proteína estimada por absorbancia a 280 nm. Como se puede ver en la *Figura 1.6*, las diferentes diluciones de la fracción 3 presentaron una banda que migró una distancia similar al estándar de punto isoeléctrico 3,5. Este resultado explica el comportamiento observado en la cromatografía de intercambio aniónico realizada a pH 5,0 al cual la proteína se encontraba cargada negativamente adsorbiéndose al intercambiador. Teniendo presente el resultado observado en la PAGE-SDS (*Figura 1.5*), la presencia de una sola banda de proteína en el isoelectroenfoque indicaría que en la muestra están presentes dos proteínas de idéntico punto isoeléctrico, o que estamos en presencia de una proteína multimérica, ya que esta electroforesis se desarrolló en condiciones no desnaturizantes.

De la combinación de la precipitación de proteínas presentes en el sobrenadante de cultivo de *Janibacter* R02 mediante el agregado de acetona, su posterior disolución y cromatografía de intercambio iónico, fue posible aislar al menos una proteína con actividad lipasa, la cual posee un punto isoeléctrico de 3,5 aproximadamente. Dado que esta estrategia permitió purificar una baja cantidad de proteína, se decidió explorar otras alternativas que permitieran satisfacer las cantidades necesarias para el objetivo planteado.

Se diseñó una segunda estrategia de purificación mediante cromatografía de exclusión molecular, como alternativa a la cromatografía de intercambio iónico. Se tomó como muestra de partida del proceso de purificación el PA correspondiente a 50 mL de cultivo de *Janibacter* R02, el que se disolvió en 6 mL de buffer fosfato de sodio y potasio 50 mM pH 7,0. De este último se utilizó 1,0 mL para llevar a cabo una cromatografía de exclusión molecular o de gel filtración (CGF) en las condiciones descritas en 1.3.2.3.3, el eluido se recogió en fracciones de 0,5 mL. En la *Figura 1.7A* se muestra el perfil cromatográfico obtenido, donde se puede apreciar la presencia de diversos picos, dejando en evidencia la complejidad de la muestra de partida. Se le realizó un ensayo de actividad cualitativo utilizando MUF-butirato como sustrato a las diferentes fracciones obtenidas y se constató que solamente los picos que contienen las fracciones 16 y 34 indicadas en la figura, presentan actividad lipasa; estas dos fracciones corresponden al máximo de absorbancia a 280 nm de los picos que las contienen. A partir del cromatograma podemos afirmar que la fracción 16 corresponde a proteínas o agregados proteicos de

peso molecular mayor a 70 kDa ya que dicha fracción eluye en el volumen muerto de la columna utilizada. Adicionalmente las fracciones que presentaron actividad lipasa fueron liofilizadas y disueltas en buffer fosfato de sodio y potasio 50 mM pH 7,0 y evaluadas mediante PAGE-SDS cuyo resultado se muestra en la *Figura 1.8*. Como puede apreciarse la muestra correspondiente a la fracción 34 presenta una banda de proteína mayoritaria de peso aproximado 20 kDa, mientras que la muestra correspondiente a la fracción 16 es una mezcla de proteínas de variado peso molecular, siendo una de las bandas de peso similar al observado para la banda presente en la fracción 34. Dada la condición desnaturizante de esta electroforesis podríamos aventurarnos a decir que la fracción 16 está constituida en parte por agregados de la proteína presente en la fracción 34. Frente a estos resultados, se decidió continuar trabajando con la

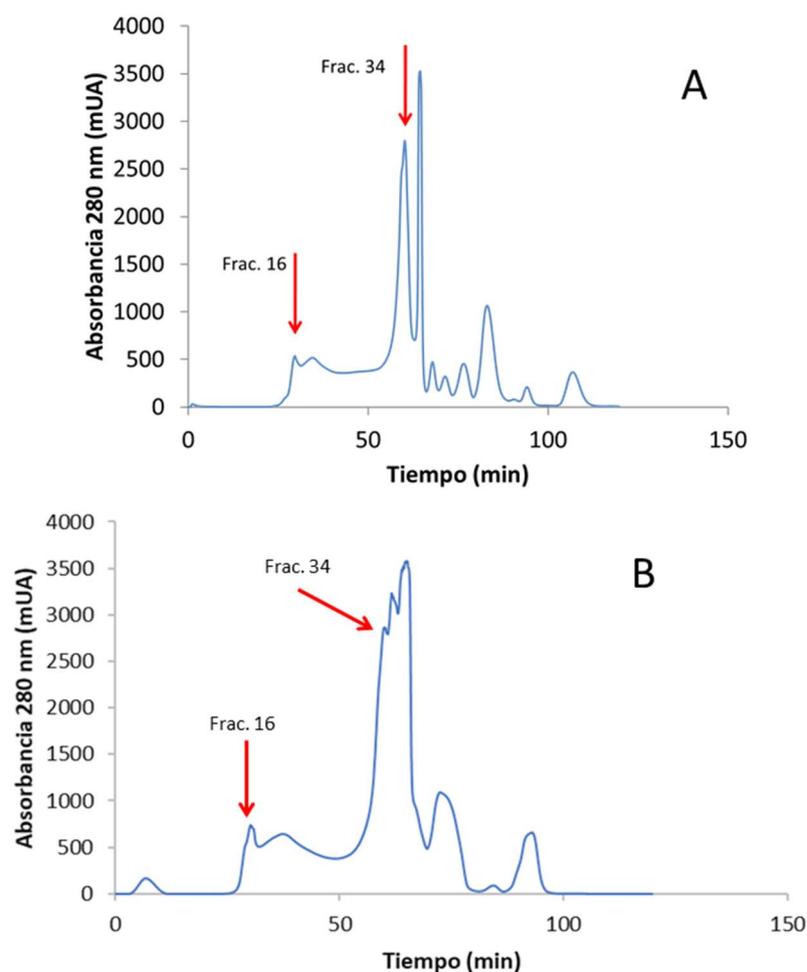


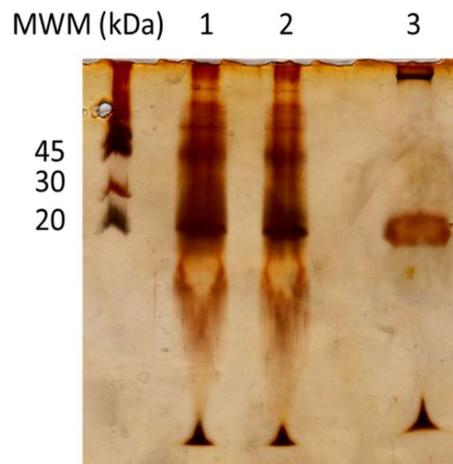
Figura 1.7. Cromatogramas de la CGF, muestra aplicada: A) PA, B) sobrenadante de cultivo *Janibacter* R02 liofilizado. Columna Superdex 75 10/300, flujo 0,3 mL/min. En ambos casos medido en absorbancia a 280 nm en función del tiempo. Las flechas rojas indican las fracciones que presentaron actividad frente a MUF-butirato.

fracción 34 ya que se trata de una muestra simple en cuanto a la cantidad de proteínas presentes.

Con el fin de disminuir la cantidad de pasos de la purificación y acortar el tiempo que insume, se llevó a cabo la cromatografía de exclusión molecular a partir del sobrenadante de cultivo liofilizado, disuelto en buffer fosfato de sodio y potasio 50 mM pH 7,0, en similar concentración que el PA. Como se aprecia en la *Figura 1.7B*, el perfil de elución es similar al obtenido a partir del PA. Nuevamente las fracciones 16 y 34 señaladas fueron las que presentaron actividad frente a MUF butirato. De la comparación entre los cromatogramas se observa que, si bien los dos perfiles de elución son similares, no son idénticos. Se logra mejor resolución del pico que contiene a la fracción 34, cuando se parte del precipitado con acetona al 50% v/v, ya que esta

remueve proteínas contaminantes, por lo que se conserva dicho paso dentro del protocolo de purificación.

La combinación de la precipitación de las proteínas presentes en el sobrenadante del medio de cultivo de *Janibacter* R02 con acetona al 50% v/v, con la cromatografía de exclusión molecular en la columna Superdex 75 10/300, fue una estrategia exitosa ya



*Figura 1.8. Evaluación de las fracciones con actividad lipasa obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular mediante PAGE-SDS. gel homogéneo 20%, revelado con técnica de plata. Carriles 1 y 2 corresponden a la fracción 16, carril 3 corresponde a la fracción 34, MWM corresponde a Amersham low molecular weight marker calibration kit.*

que permitió obtener una fracción con actividad lipasa, que mostró buena pureza cuando fue analizada por electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Sin embargo, no se debe perder de vista que la cromatografía de exclusión molecular limita la cantidad de muestra que se puede purificar cada vez (1,0 mL para la columna usada), lo que llevó a la necesidad de repetir el proceso y recolectar la fracción 34 de interés (la cual se denominó Lip J1), hacer un pool y concentrarla mediante liofilización.

Con el fin de conocer la identidad de la proteína presente en la fracción 34 obtenida de la cromatografía de exclusión molecular realizada al PA, y con vistas al desarrollo de un sistema de expresión heteróloga de la misma, se decidió realizar el estudio de la huella peptídica de la proteína presente. Para ello se partió de una electroforesis bidimensional donde, en primera instancia se realizó un isoelectroenfoque seguido de una PAGE-SDS. Como se puede apreciar en la *Figura 1.9*, el isoelectroenfoque dejó en evidencia la presencia de una gran cantidad de proteínas de diferente punto isoeléctrico, y similar

peso molecular (entre 10 y 20 kDa), que se encontraban en la muestra de origen, que no se visualizaban cuando se realizó la electroforesis unidimensional.

Se seleccionaron las bandas marcadas en rojo y se analizaron por MALDI-TOF; en la Tabla 1.5 se muestran los resultados obtenidos para aquellas bandas que presentaron homología con alguna proteína depositada en bases de datos. Pese a que ninguna de ellas presentó homología específicamente con lipasas, es importante resaltar que dos de las muestras presentaron homología con enzimas hidrolíticas, y ambas fueron identificadas a partir de una cepa del mismo género que la utilizada en este trabajo. Las diez muestras restantes no presentaron homología con ninguna proteína reportada hasta el momento que se realizó el ensayo.

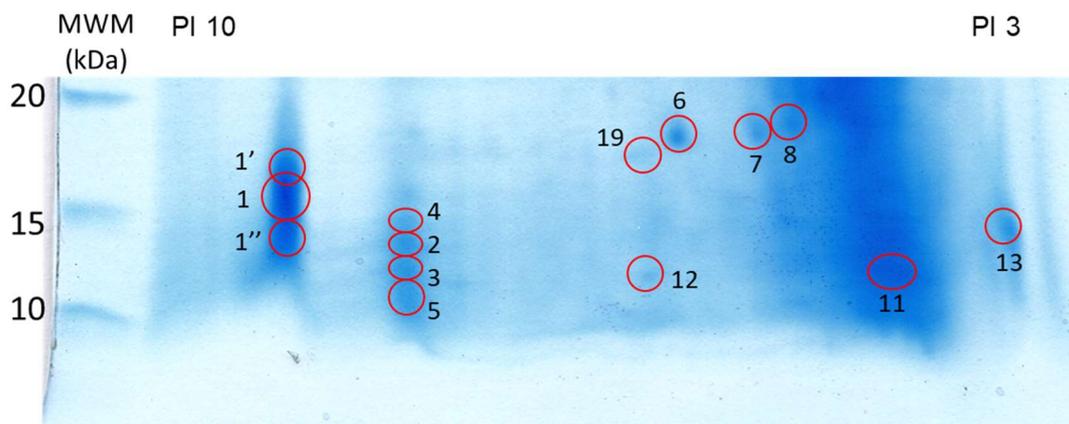


Figura 1.9. Electroforesis bidimensional, sobre el margen izquierdo se encuentran las proteínas con el punto isoeléctrico más alto (PI 10) y sobre la derecha las proteínas con el punto isoeléctrico más bajo (PI 3). El revelado se realizó con Coomassie coloidal.

Tabla 1.5 Resumen del estudio de masas de los péptidos aislados a partir de la fracción 34 del PA.

Muestra	Masa molecular estimada de la banda (kDa)	PI	Proteína identificada	Masa molecular teórica (kDa)
1	15	9	N-acetilglucosaminidasa de <i>S. aureus</i>	137
			Antígeno B de <i>S. aureus</i>	8.1
			Peptidasa S8 de <i>Janibacter hoylei</i>	51
6	15-20	6	Proteína hipotética SAP054A_001 de <i>S. aureus</i>	76.2
11	10-15	4	Proteína hipotética SAV0282 de <i>S. aureus</i>	11
			Tioredoxina de <i>S. aureus</i>	11.4
19	15-20	7	Proteasa de <i>Janibacter hoylei</i>	80

El hecho de que la proteína de interés sea proveniente de un microorganismo poco estudiado y aun no secuenciado significó una limitación para la identificación mediante homología. La comparación con proteínas cuya secuencia estaba depositada en base de datos no fue concluyente, por lo que no se logró obtener la identidad de la enzima responsable de la actividad lipasa, observada en la fracción 34.

#### 1.4.3. Estudios de caracterización de la lipasa Lip J1

En paralelo con los intentos de identificación por MALDI de la proteína presente en la fracción 34, la cual pasamos a llamar lipasa Lip J1, se comenzó con la caracterización bioquímica de la misma. Esta decisión se basó en que la proteína presente en dicha muestra presentó homología con proteínas hidrolíticas identificadas a partir de otros individuos del mismo género que el aislamiento en estudio.

##### 1.4.3.1 Determinación del pH óptimo

En la *Figura 1.10* se muestra el resultado del ensayo de determinación del pH óptimo para Lip J1. Este estudio se llevó a cabo según el procedimiento descrito en 1.3.2.5. utilizando pNP butirato como sustrato. Como se puede apreciar en la imagen el pH óptimo de la enzima se encuentra en el rango de pH 7,5 a 9,0, con un máximo aparente en 8,0. Cabe destacar que a pH menores a 6,5 la actividad no fue cuantificable y el error observado fue elevado, mientras que a pH mayores a 9,5 el sustrato utilizado sufre auto hidrólisis.

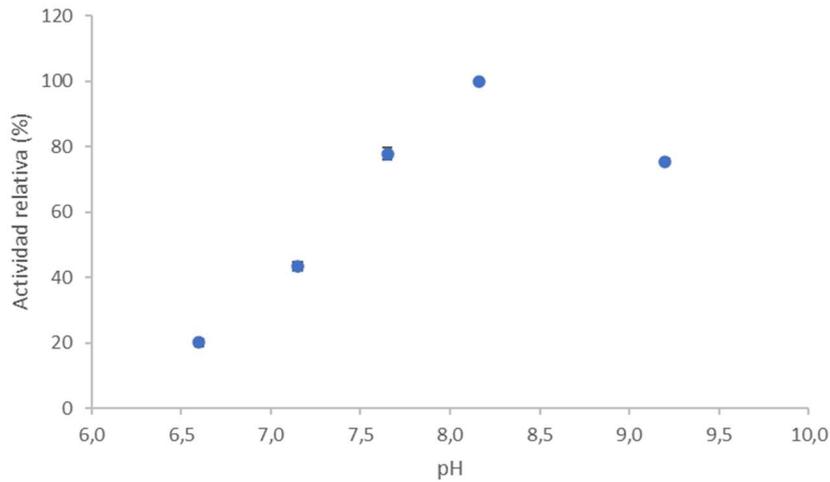


Figura 1.10. Ensayo de pH óptimo para Lip J1. En el eje vertical se muestra actividad relativa a la medida a pH 8,0. En todos los puntos reportados la desviación estándar fue menor al 1,5 %.

#### 1.4.3.2 Estudio de estabilidad frente al pH

Para el estudio de estabilidad frente al pH se prepararon alícuotas de la lipasa Lip J1 a cada uno de los pH indicados en la Figura 1.11 y las mismas fueron incubadas a 4 °C durante 24 horas. Al cabo de ese tiempo se determinó la actividad remanente utilizando pNP butirato como sustrato en las condiciones descritas en la unidad de enzima (pH 8,0 y temperatura ambiente), y se la comparó con la actividad que presentaba la muestra previo a ser incubada. Como se puede apreciar, la enzima conserva un porcentaje de

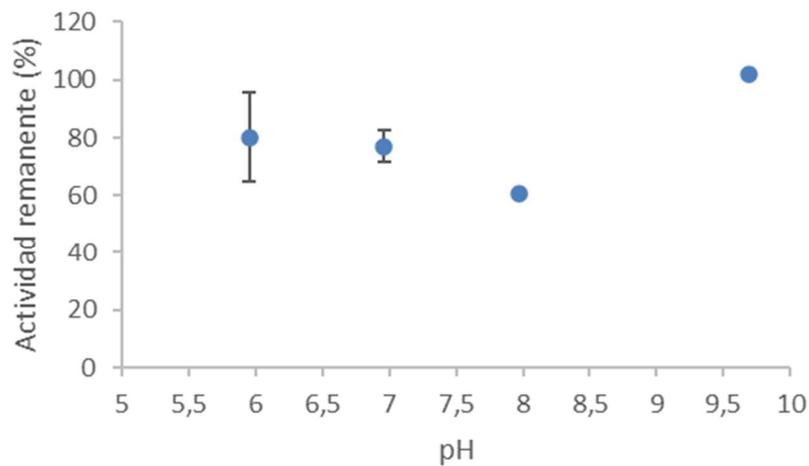
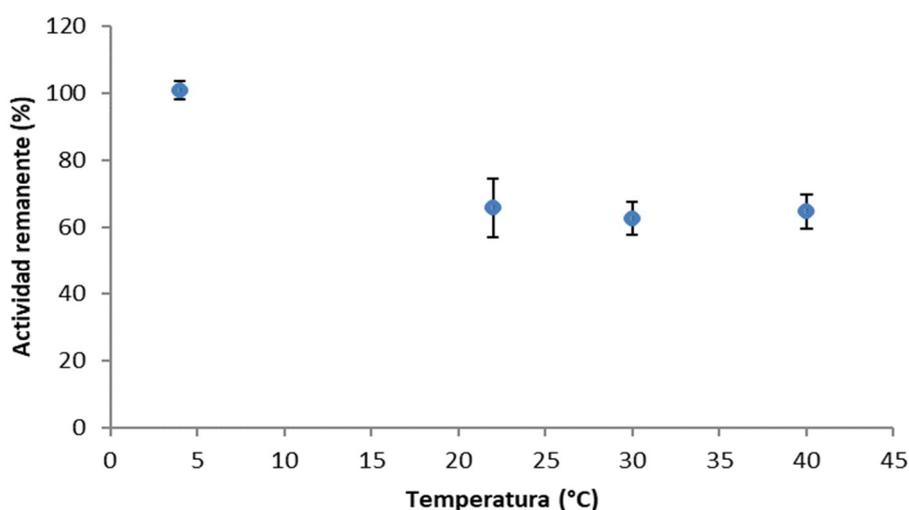


Figura 1.11. Estabilidad frente al pH, indicada como % de actividad remanente respecto a la actividad inicial previo a la incubación. Las muestras fueron incubadas a cada pH a 4 °C durante 24 horas, las medidas de actividad se realizaron en las condiciones definidas en la unidad de enzima (pH 8,0).

actividad remanente superior al 60 % para todos los pH estudiados, destacándose a pH 9,6 donde conserva el 100 % de la actividad. Por lo que podemos decir que la enzima presenta una estabilidad moderada en las condiciones estudiadas a pH entre 6 y 8, siendo muy buena a pH 9,6.

#### 1.4.3.3 Estudio de estabilidad frente a la temperatura

Se evaluó la estabilidad de Lip J1 frente a la temperatura, para ello se incubó la enzima a diferentes temperaturas (4, 22, 30 y 40 °C) durante 24 horas, a pH 8,0. Al cabo de ese tiempo se determinó la actividad remanente utilizando pNP butirato como sustrato siguiendo el procedimiento descrito en 1.3.2.1, y se la comparó con la actividad que presentaba la muestra previo a ser incubada. Como se aprecia en la *Figura 1.12*, la enzima conservó en 100 % de la actividad inicial luego de ser incubada a 4 °C, mientras que mostró una pérdida de actividad aproximadamente del 40 % a las demás temperaturas evaluadas.



*Figura 1.12. Estabilidad frente a la temperatura, indicada como % de actividad remanente respecto a la actividad inicial observada previo a la incubación. Las muestras fueron incubadas a las diferentes temperaturas durante 24 horas, las medidas de actividad se realizaron en las condiciones definidas en la unidad de enzima.*

#### 1.4.3.4 Estudio de hidrólisis de trioleína

Con el objetivo de identificar si la actividad enzimática responsable de la síntesis de biodiesel, observada en los ensayos preliminares realizados a partir del sobrenadante de cultivo de *Janibacter* R02, también se observaba en las fracciones 16 y 34 de la

purificación mediante gelfiltración, se diseñó un ensayo de hidrólisis de trioleína. Este ensayo parte de la base que una lipasa capaz de catalizar la síntesis de biodiesel será capaz de catalizar la hidrólisis de triacilgliceroles. Dado que la reacción de hidrólisis es más sencilla de llevar a cabo que la de síntesis de biodiesel se realizó la primera en las condiciones descritas en 1.3.2.8, utilizando como biocatalizador el sobrenadante de cultivo de *Janibacter* R02 liofilizado y las fracciones 16 y 34, donde se evaluó el porcentaje de ácido oleico liberado respecto al presente en la mezcla de reacción sin enzimas. En primer lugar, se realizó una evaluación cualitativa mediante TLC según lo descrito en 1.3.2.10, al comparar el porcentaje de ac. oleico en las muestras correspondientes a las fracciones ensayadas con el presente en el control negativo, queda en evidencia que las tres muestras fueron capaces de hidrolizar el sustrato ofrecido, pero no fue posible determinar si alguna de ellas tuvo mejor desempeño que las otras fracciones analizadas. Por ello se decidió proceder al análisis cuantitativo mediante cromatografía gaseosa según lo descrito en 1.3.2.9, utilizándose ácido palmítico como estándar interno. En la Tabla 1.6 se muestran los porcentajes de ácido oleico presente al final de la reacción calculados como la relación entre áreas del pico correspondiente al ácido oleico y el pico correspondiente al ácido palmítico introducido en una concentración conocida como estándar interno (ver *Anexos 3, 4 y 5*). El porcentaje de ácido oleico observado en la muestra control negativo, corresponde al ácido libre presente en el aceite de oliva utilizado como fuente de trioleína en este ensayo.

Tabla 1.6. Porcentaje de ácido oleico presente en la mezcla de reacción luego de 24 horas.

Muestra	% de ácido oleico
Control negativo	3,3
SN medio de cultivo	6,2
Frac. 16	6,5
Frac. 34	5,2

Los resultados obtenidos mediante el análisis por cromatografía gaseosa ratifican lo observado por TLC, no hay diferencia en el porcentaje de hidrólisis logrado por las diferentes muestras ensayadas. Esto reafirma lo comentado en la sección 1.4.2, donde se propuso que la fracción 16 está constituida en parte por agregados de la proteína presente en la fracción 34.

Si bien las tres fracciones estudiadas fueron capaces de hidrolizar trioleína, lo cual las posiciona como potenciales catalizadores de la reacción de síntesis de biodiesel, es importante resaltar que los porcentajes de hidrólisis obtenidos fueron bajos para todas ellas.

Teniendo en cuenta que el objetivo era desarrollar biocatalizadores inmovilizados capaces de ser competitivos frente al actual proceso de síntesis química de biodiesel, los resultados obtenidos desalentarían el uso de Lip J1 como potencial biocatalizador para llevar adelante la síntesis de biodiesel.

#### 1.4.3.5 Consideraciones finales respecto a la purificación y caracterización de Lip J1

De las estrategias de purificación desarrolladas, la precipitación con acetona en combinación con cromatografía de exclusión molecular o intercambio iónico demostró ser la más efectiva para cumplir con el objetivo de aislar proteínas con actividad lipasa a partir del sobrenadante de cultivo de *Janibacter* R02. Sin embargo, en ambas estrategias utilizadas las fracciones purificadas presentan muy baja concentración de proteínas, lo cual dificulta cualquier uso posterior de las enzimas.

En el caso de la fracción 34 obtenida mediante las estrategias de cromatografía de exclusión molecular a partir del precipitado con acetona al 50 % v/v, se buscó conocer la identidad de la proteína purificada, mediante análisis de la huella peptídica. La muestra empleada para dicho fin, que mostró una única banda cuando fue analizada mediante PAGE-SDS, resultó ser una mezcla de proteínas en la electroforesis bidimensional. La complejidad de la muestra dificultó su análisis y los resultados obtenidos de las bandas analizadas, algunos fragmentos obtenidos a partir del análisis por MALDI TOF de la fracción 34 presentaron homología con otras enzimas pertenecientes a la categoría de enzimas hidrolíticas y además asociadas a microorganismos relacionados como *Janibacter hoylei*, aunque ninguno de ellos presentó homología con otras lipasas reportadas hasta el momento en la base de datos del NCBI.

Como se señaló anteriormente, el bajo rendimiento obtenido con la lipasa presente en la fracción 34 para la hidrólisis de trioleína no la posiciona como un posible competidor de la síntesis química de biodiesel. Sin embargo, es relevante destacar algunas

propiedades observadas en los ensayos de caracterización bioquímica de esta enzima, como la estabilidad a pH alcalino (pH 9,5) y la buena estabilidad térmica medida a tiempo largo (24 horas), que la convierten en un potencial biocatalizador para otro tipo de aplicaciones.

Debido a todos los aspectos arriba mencionados se decidió no continuar con estas estrategias de purificación, cambiando totalmente el enfoque para la identificación de lipasas de *Janibacter* R02, recurriendo a una estrategia molecular.

#### 1.4.4. Desarrollo de sistemas de expresión de lipasas de *Janibacter* R02

Este nuevo enfoque partió del trabajo previo realizado por el B.C. Diego Rodríguez, en el cual se diseñó la estrategia que se muestra en la *Figura 1.13*. Se construyeron *clusters* de secuencias codificantes para lipasas y se analizaron en busca de regiones altamente conservadas. Basado en las regiones detectadas se diseñaron cebadores que permitieran amplificarlas (1). Se realizó la amplificación mediante PCR utilizando como molde el ADN genómico de *Janibacter* R02, obteniéndose un amplicón de 260 pares de bases aproximadamente, el cual fue secuenciado. En base a dicha secuencia se diseñaron nuevos cebadores que permitieran, junto con oligonucleótidos degenerados, amplificar hacia afuera del fragmento secuenciado (2). Siguiendo esta estrategia de *genome walking* se pudo identificar el gen codificante para la proteína de interés la cual se denominó Lip J2, constituido por 1272 pares de bases (S. Das, Noe, Paik, & Kitten, 2005). El gen identificado presentó homología con secuencias codificantes de lipasas e identidad con un marco abierto de lectura que codifica para una hipotética lipasa de *Janibacter hoylei* reportada posteriormente (Pawar et al., 2012).

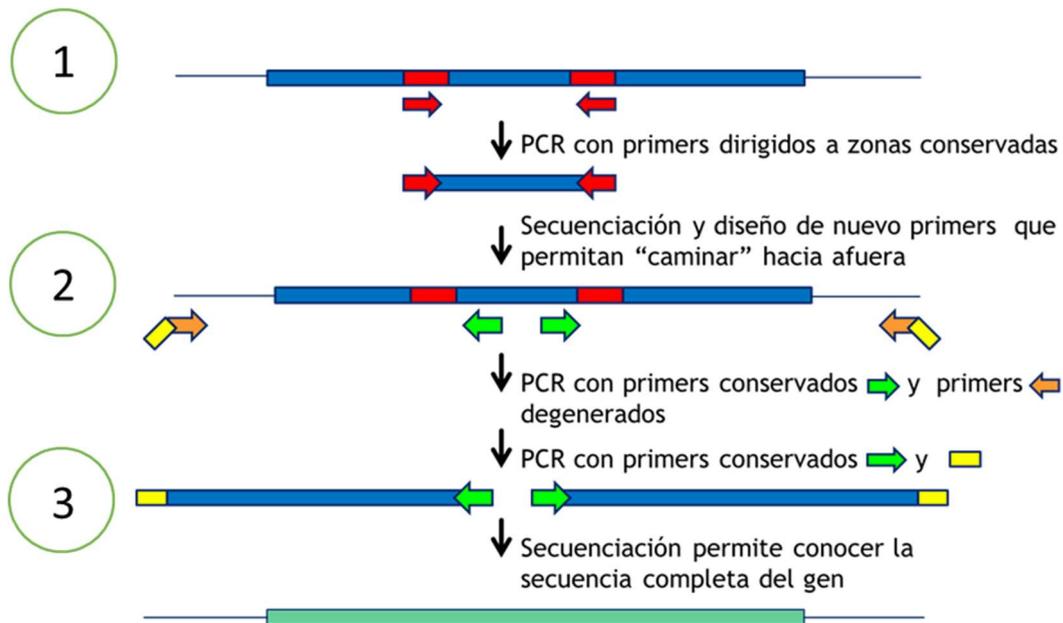


Figura 1.13. Esquema del proceso de clonado del gen codificante para Lip J2. 1 - amplificación utilizando cebadores dirigidos a las zonas conservadas. 2 - amplificación mediante estrategia "genome walking". 3 - amplificación final del gen codificante para Lip J2.

#### 1.4.4.1 Expresión de Lip J2 a partir de sistemas basados en cepas de *Escherichia coli*

Basados en la secuencia obtenida del gen codificante para Lip J2 se diseñaron los cebadores fw 14A y rv 14V (Tabla 1.3), con los cuales se amplificó dicho gen a partir del ADN genómico de *Janibacter* R02. Estos cebadores a su vez permitieron la inserción del amplicón en el plásmido pET 22b (+), mediante el uso de las enzimas de restricción Hind III y NdeI ambas con una sola posición de corte, lo que garantizó la inserción del gen en la dirección correcta. Asimismo, el diseño de la inserción fue realizado de forma que el marco de lectura del gen quede en fase con la secuencia codificante para la cola de histidina y así aprovechar esta etiqueta de afinidad al momento de la purificación. El vector construido (Figura 1.14) fue utilizado para transformar una cepa de *E. coli* Top 10, resultando en la cepa recombinante AC I a partir de la cual se multiplicó y purificó la

construcción. Con el vector purificado se realizó la transformación de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) para obtener la cepa de expresión AC III.

A partir de la cepa AC III se realizaron ensayos de expresión de Lip J2 en las condiciones descritas en 1.3.6.1, y se evaluó mediante PAGE-SDS, la producción de Lip J2 tanto en la fracción soluble (FS) como insoluble (FI). Al comparar el patrón de bandas de los ensayos

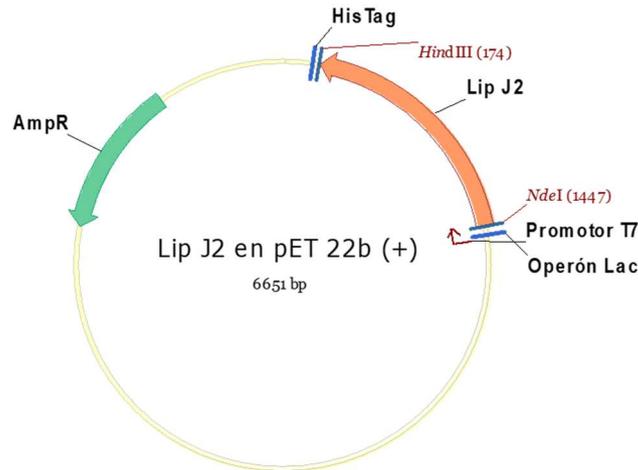
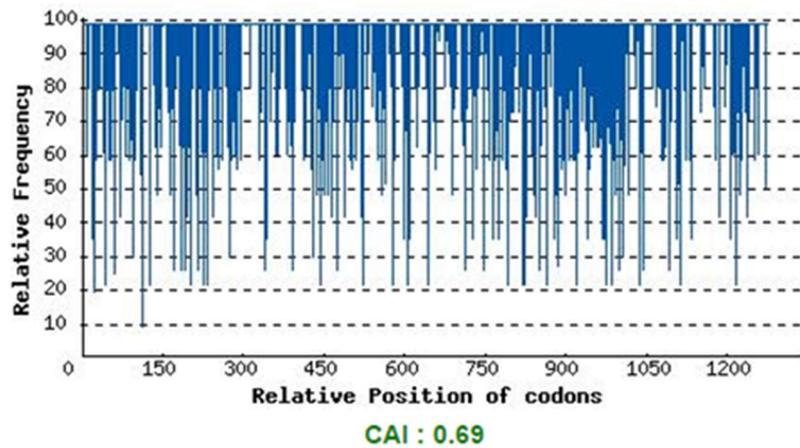


Figura 1.14. Esquema de la construcción utilizada en el desarrollo del sistema de expresión de Lip J2 en *E. coli* BL21 DE3. Se marcan las características más relevantes del vector

de expresión con el control negativo, quedaba manifiesta la diferencia del perfil de proteínas producidas. Pero al comparar los diferentes ensayos de expresión realizados a partir de un mismo clon en las mismas condiciones se observó que los resultados obtenidos entre los diferentes ensayos no mostraron un patrón de expresión definido, la expresión de proteínas no fue reproducible. Se ensayó la purificación de Lip J2 a partir de la FS mediante IMAC según el protocolo descrito por el fabricante (GE Healthcare, 2006), constatando que ninguna proteína era retenida por la columna de afinidad. Este resultado podría indicar que no se estaba alcanzando la traducción del extremo C-terminal de la proteína, donde debería encontrarse la cola de histidina. Esto sumado al patrón irregular de expresión observado en la electroforesis, nos llevó a proponer que nos encontrábamos frente a un caso de expresión truncada de la proteína de interés. Para sustentar la hipótesis, se llevó a cabo un análisis de preferencia de codones de la cepa utilizada en base al gen de Lip J2, utilizando el *software Rare Codon Analysis*, de la empresa GenScript (“GenSmart Codon Optimization,” n.d.). En base a este análisis se

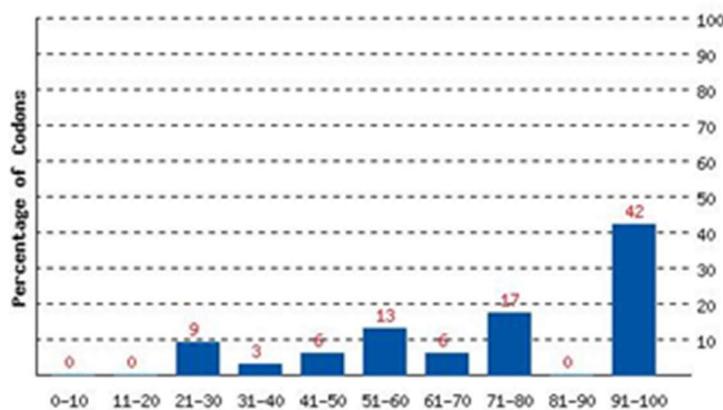
obtuvo el índice CAI (índice de adaptación de codones) y la distribución de la frecuencia con la que la cepa utiliza los codones constituyentes del gen analizado.

En la *Figura 1.15*, las barras azules indican la distribución de la frecuencia de uso de codones a lo largo de la secuencia codificante de LipJ2 por la cepa de *E. coli* seleccionada para este sistema de expresión. Para el gen en estudio el CAI fue de 0,69, mientras que el análisis realizado indica que para garantizar la efectiva expresión de una proteína dicho índice debe encontrarse entre 0,8 y 1.



*Figura 1.15. Análisis del índice de adaptación de codones del gen de Lip J2 amplificado a partir del ADN genómico de Janibacter R02.*

Por otra parte, en la *Figura 1.16* se puede ver la frecuencia con la que la cepa de *E. coli* empleada en este sistema de expresión utiliza el codón presente en el gen para codificar determinado aminoácido. Como puede observarse, solo el 42 % de los codones presentes en el gen son utilizados en muy alta frecuencia por *E. coli*, y más aún, el 9% de



*Figura 1.16. Distribución de la frecuencia de codones presentes en el gen, para la cepa de E. coli BL 21 (DE3)*

los codones presentes en el gen de Lip J2 son utilizados por esta cepa menos del 30 % de las veces que es necesario codificar determinado aminoácido.

Estos dos parámetros alertan sobre una baja eficiencia de la traducción y podrían explicar la escasa reproducibilidad observada en los ensayos de expresión. Como posible solución a este inconveniente transformamos la cepa de *E. coli* Rosetta-Gami (DE3) con el vector pET 22 b (+)-LipJ2, obteniendo la cepa AC V. Esta cepa expresa 7 codones poco frecuentes en este microorganismo, pese a esto no se logró la expresión de Lip J2, probablemente porque existen otros codones involucrados en la baja eficiencia de expresión aparte de los aportados por esta cepa.

Para resolver el problema de la expresión truncada se sintetizó *de novo* el gen, realizando previamente una optimización de codones para la expresión en *E. coli*, dicha tarea se encomendó a la empresa GenScript. El gen sintetizado y optimizado presentó un CAI de 0,88, mientras que todos los codones son utilizados por *E. coli* al menos el 50 % de las veces, solventando así los problemas de expresión antes experimentados. Con el gen sintetizado nuevamente se construyó un vector de expresión siguiendo la misma estrategia antes descrita, obteniéndose un vector basado en pET 22 b (+) conteniendo el gen de Lip J2 optimizado para su expresión en *E. coli*. Con este vector se transformó una cepa de *E. coli* Top 10, obteniéndose la cepa AC II para la propagación del vector, y posteriormente la cepa *E. coli* BL 21 (DE3) logrando la cepa AC IV apta para la expresión de la proteína de interés. A partir de esta cepa se repitió el ensayo de expresión, se lisaron las células según los procedimientos descritos en 1.3.3.1 y se evaluó la producción de proteína en la FS y la FI mediante PAGE-SDS como se aprecia en la *Figura 1.17*.

Se tomaron alícuotas del cultivo a 0, 5, 24 y 48 horas, y se comparó el perfil de expresión de la cepa de interés con la cepa control, correspondiente *E. coli* BL21 (DE3) (pET 22b (+)). Como se aprecia en el gel de la izquierda en la *Figura 1.17*, el patrón de bandas de las fracciones solubles del clon AC IV y el control negativo es similar, difiriendo únicamente en la intensidad de las bandas. Mientras que en el gel correspondiente a las FI se aprecia una banda que está presente en el clon AC IV pero no en el control negativo, la cual tiene un peso molecular estimado de 42 kDa lo que concuerda con la proteína de interés. Además, queda de manifiesto que a las 5 horas post inducción la banda

correspondiente a la proteína de interés es la mayoritaria, mientras que a tiempos mayores se aprecia la producción de proteínas contaminantes. De este ensayo podemos

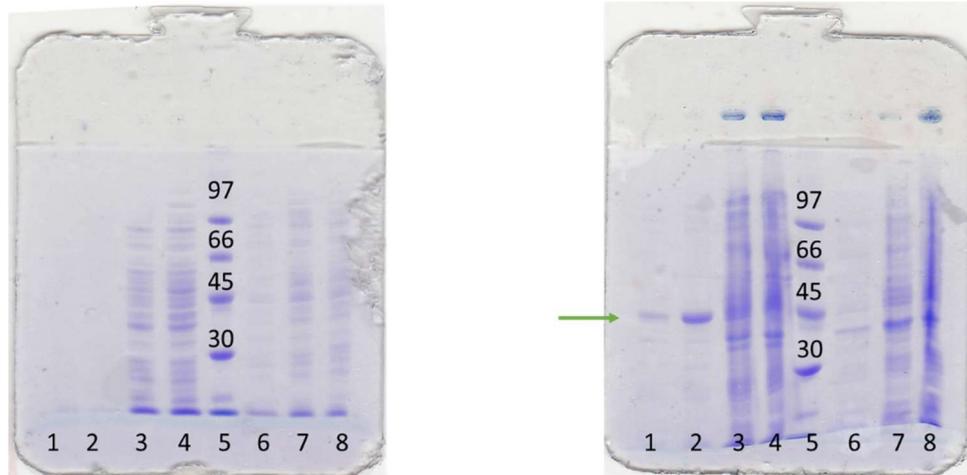


Figura 1.17. PAGE-SDS gel homogéneo 12,5 % del proceso de expresión de Lip J2, tinción con Coomassie. Imagen izquierda, evaluación de la fracción soluble. Carriles 1, 2, 3, y 4 corresponden a tiempo 0, 5, 24 y 48 horas post inducción respectivamente para la cepa AC IV; carril 6, 7 y 8 corresponden a tiempo 5, 24, y 48 horas post inducción para el control negativo de expresión. Imagen derecha, evaluación de la fracción insoluble. Carriles 1, 2, 3, y 4 corresponden a tiempo 0, 5, 24 y 48 horas post inducción respectivamente para la cepa AC IV; carril 6, 7 y 8 corresponden a tiempo 5, 24, y 48 horas post inducción para el control negativo de expresión. En ambos casos el carril 5 corresponde al marcador de peso molecular “Amersham low molecular weight marker calibration kit”, los pesos moleculares señalados están expresados en kDa.

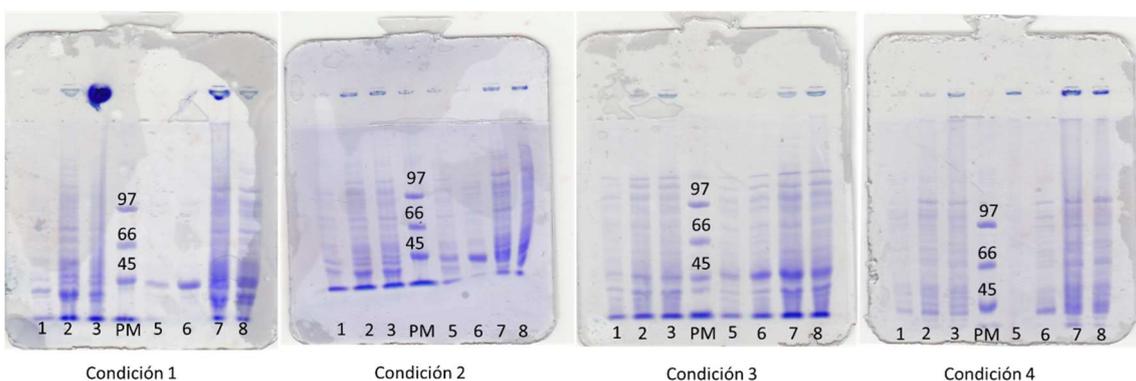
concluir que se logró la expresión de una proteína del PM esperado para Lip J2 y que la misma se expresa bajo la forma de cuerpos de inclusión; por lo que llevamos a cabo modificaciones en las condiciones del ensayo de expresión con el fin de mejorar la solubilidad de la proteína expresada.

En la Tabla 1.7 se especifican los cambios en las condiciones de cultivo e inducción que se llevaron a cabo, salvo los casos donde se especifica lo contrario el cultivo se realizó en medio LB según lo descrito en 1.3.3.1. Una temperatura de expresión baja enlentece el proceso de traducción dando más tiempo a que se lleve a cabo el correcto plegamiento de la proteína en cuestión, lo que podría colaborar a la expresión soluble de la enzima, pero a su vez podría ir en detrimento de la cantidad de proteína expresada en un determinado lapso (condición 1). En caso contrario el aumento de la temperatura de expresión favorece la velocidad del proceso de traducción y también aumentan los errores en el plegamiento (condiciones 2, 3 y 4), pese a ello se ha visto ejemplos donde

se logra expresión soluble en sistemas inducidos a 42 °C (Rosano & Ceccarelli, 2014; San-Miguel, Pérez-Bermúdez, & Gavidia, 2013; Schein & Noteborn, 1988). En la *Figura 1.18* se muestran la evaluación mediante PAGE-SDS de las fracciones insolubles de los ensayos de expresión llevados a cabo en las condiciones listadas en la *Tabla 1.7*.

*Tabla 1.7. Estudio del efecto en la expresión de Lip J2 a partir del clon AC IV por variación en las condiciones de cultivo e inducción*

Condición	Temperatura inicial de cultivo	Temperatura post inducción	Observaciones
1	37 °C	21 °C	-
2	37 °C	28 °C	-
3	37 °C	37 °C	-
4	37 °C	42 °C	-
5	37 °C	37 °C	AIM NZytech
6	21 °C	21 °C	AIM NZytech



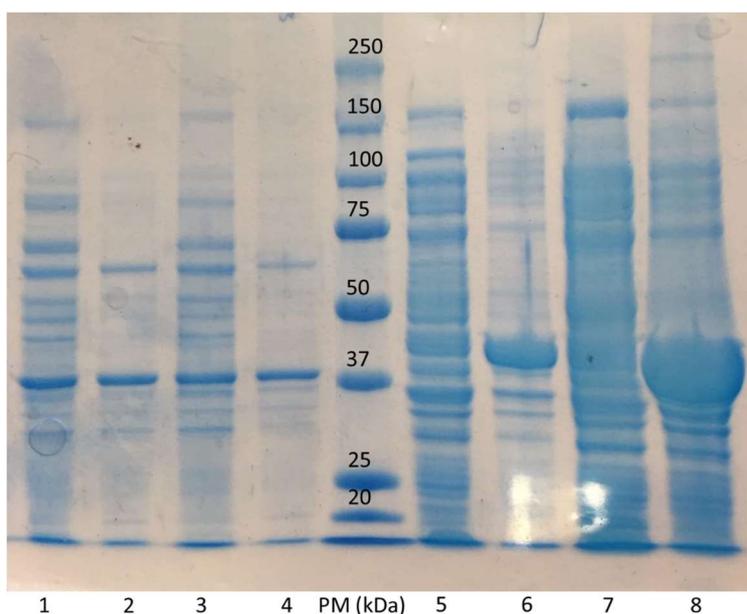
*Figura 1.18. PAGE-SDS gel homogéneo 7,5%, tinción con Coomassie. Cada gel corresponde a una condición de cultivo y expresión (ver *Tabla 1.7*). Todos los gels corresponden a la evaluación de la fracción insoluble de los ensayos de expresión. Carriles 1, 2 y 3 corresponden a los tiempos de inducción 0, 24 y 48 horas para la cepa control negativo, carriles 5, 6, 7 y 8 corresponden a los tiempos de inducción 0, 5, 24 y 48 horas para el mutante AC IV.*

Paralelamente se ensayó el cultivo en el medio de autoinducción (AIM). En este medio la expresión de proteínas se da en forma gradual a medida que se consume la glucosa presente en el mismo, esta gradualidad disminuye la velocidad de expresión lo que podría favorecer la expresión soluble por la misma razón antes comentada (condiciones 5 y 6) (*Figura 1.19*) (J. Xu, Banerjee, Pan, & Li, 2012).

La variación de la temperatura de inducción no mejoró los problemas de solubilidad observados anteriormente, en todos los casos la enzima de interés se expresó bajo la forma de cuerpos de inclusión. Los gels correspondientes a la fracción soluble no

mostraron ninguna banda de proteína de peso similar al esperado, en ninguna de las condiciones ensayadas (ver Anexo 1). Asimismo, como se puede apreciar en la *Figura 1.18*, al aumentar la temperatura de inducción no se produce un aumento de la cantidad de proteína de interés expresada bajo la forma de cuerpos de inclusión, pero si pareciese aumentar la cantidad de proteínas contaminantes producidas.

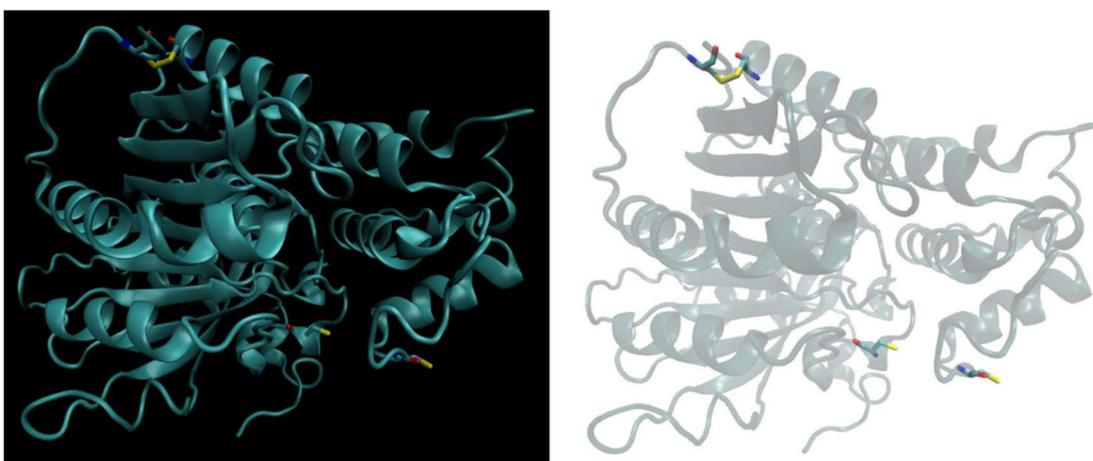
En la *Figura 1.19* se muestran los resultados obtenidos para las condiciones 5 y 6, las cuales fueron llevadas a cabo utilizando medio de autoinducción. Cabe aclarar que en este ensayo es difícil de establecer el tiempo de inicio de la inducción, ya que la misma se da una vez que se consume la glucosa presente en el medio. Como se aprecia en las muestras del clon AC IV existe producción de una proteína de peso similar al esperado, la cual nuevamente se produce bajo la forma de cuerpos de inclusión. Dado que no es posible concluir sobre si existe producción soluble de la misma, se ensayó la purificación de Lip J2 a partir de la FS mediante IMAC según el protocolo descrito por el fabricante de las columnas cromatográficas (Sepharose, Performance, Sepharose, Performance, & Hp, n.d.), y no se constató la adsorción de ninguna proteína a la columna, por lo que concluimos que la enzima de interés no se expresó en forma soluble.



*Figura 1.19. PAGE-SDS gel homogéneo 12,5 %, tinción con Coomassie. Carriles 1 y 2 corresponden al control negativo de la condición 5, fracción soluble e insoluble respectivamente; carriles 3 y 4 corresponden al control negativo de la condición 6, fracción soluble e insoluble respectivamente; carriles 5 y 6 corresponden a la condición 5, fracción soluble e insoluble respectivamente; carriles 7 y 8 corresponden a la condición 6, fracción soluble e insoluble respectivamente, en ambos casos para la cepa AC IV. Todas las muestras corresponden a las 24 horas de la inducción (estimada).*

En este caso es importante destacar que se obtuvo mayor cantidad de proteína que en las condiciones 1 a 4 debido probablemente a la mayor cantidad de biomasa alcanzada, algo característico cuando se utilizan este tipo de medios de cultivo. Asimismo, la condición que aportó mayor cantidad de proteína parece ser aquella en que la etapa de inducción de la expresión se llevó a cabo a 21 °C.

Los resultados obtenidos hasta este punto nos llevaron a postular la hipótesis de que el plegamiento incorrecto puede deberse a la formación incorrecta o inexistente de puentes de disulfuro entre los residuos de cisteína presentes en la proteína. En la *Figura 1.20* se muestra un modelo tridimensional de LipJ2, creado en base a homología con otras lipasas. En amarillo se muestran los azufres correspondientes a las cuatro cisteínas presentes en Lip J2, y se puede apreciar que dos de ellas forman un enlace disulfuro



*Figura 1.20. Modelo tridimensional de Lip J2, creado en base a homología con otras lipasas, en amarillo se muestran los azufres correspondientes a los residuos de cisteína.*

mientras que las otras dos no lo hacen, aunque espacialmente se encuentran próximas. El medio citoplasmático reductor de la cepa de *E. coli* utilizada no proporciona el ambiente oxidante propicio para la formación de este tipo de enlaces, por lo que se decidió desarrollar un nuevo sistema donde se favorecieran este tipo de interacciones. Para ello se construyó la cepa recombinante AC VI, obtenida por transformación de la cepa *E. coli* SHuffle con el vector pET 22 b (+) portando la secuencia optimizada de LipJ2. Esta cepa tiene un citoplasma menos reductor lo que favorece la formación de puentes disulfuro. Esta estrategia tampoco aportó una solución para los problemas de solubilidad, no mejorando los resultados obtenidos con la cepa AC IV.

Dado que los intentos de expresión de LipJ2 recombinante en forma soluble no fueron exitosos, se decidió explorar otros sistemas basados en microorganismos que presentarán características diferentes a *E. coli*, trabajándose en paralelo en la solubilización de los cuerpos de inclusión, estos resultados serán discutidos en el Capítulo 2.

#### 1.4.4.2 Expresión de Lip J2 a partir de sistemas basados en *Pseudomonas sp.*

Se eligió *Pseudomonas sp* como organismo hospedador del sistema de expresión dado que presenta un sistema de exportación de proteínas al medio extracelular, para el cual se conoce gran parte de la forma en la que opera. Esto podría ser una ventaja a la hora de purificar la enzima de interés ya que generalmente la cantidad de proteínas exportadas fuera de la célula es baja. En particular se seleccionó la cepa de *Pseudomonas* PAO1  $\Delta$ Lip H pues su mutación en LipH, foldasa necesaria para el correcto plegamiento de sus propias lipasas, hace que la actividad lipolítica de la cepa sea nula. Por otra parte, esta cepa tiene un sistema de transporte del tipo 1 (SST 1) que permite la secreción de diversas proteínas al medio extracelular, este transportador es conocido como “ABC transporter”. Para el caso del transporte de proteínas, el mismo es mediado por el reconocimiento de un péptido en el extremo C-terminal de la proteína en cuestión, que se denomina región LARD y es codificado por la secuencia denominada “ABC Minimal region” (región LARD). Además, la cepa es sensible a cloranfenicol, lo cual es ventajoso para la selección de los mutantes, y resistente a tetraciclina lo que permite mayor control de los posibles microorganismos contaminantes. Para el desarrollo del vector se eligió el plásmido pBBR1MCS el cual, entre otros atributos, confiere resistencia a cloranfenicol en bacterias que facilita la selección de los mutantes, la expresión de proteínas es inducible mediante el agregado de IPTG ya que el gen de interés se encuentra bajo la influencia del promotor *lac* y puede ser utilizado tanto en *E. coli* como en *Pseudomonas sp.*

Se diseñó y construyó un vector que se denominó pBBR1MCS Lip J2, que contiene todos los elementos necesarios para la expresión de Lip J2 en *Pseudomonas sp* como puede verse en la *Figura 1.21*. Para su construcción se amplificó el gen de Lip J2 optimizado para *E.coli* a partir de la construcción adquirida de la empresa GenScript, esta

amplificación se llevó a cabo utilizando el cebador 5' PF 96 A el cual consta de dos regiones, una externa que hibrida con el vector pBBR1MCS y una interna complementaria al gen de interés, y un cebador 3' PR 96B el cual hibrida con el final del

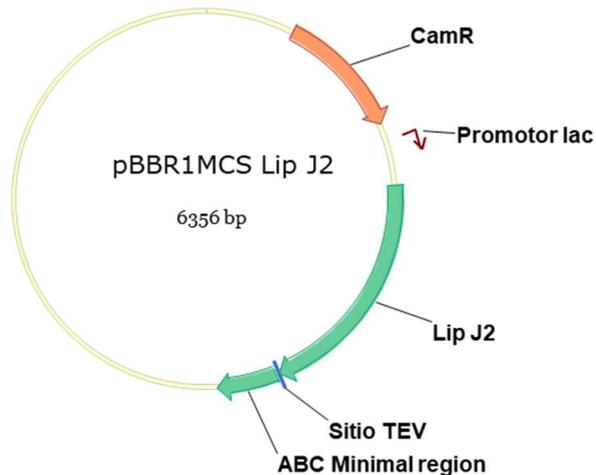
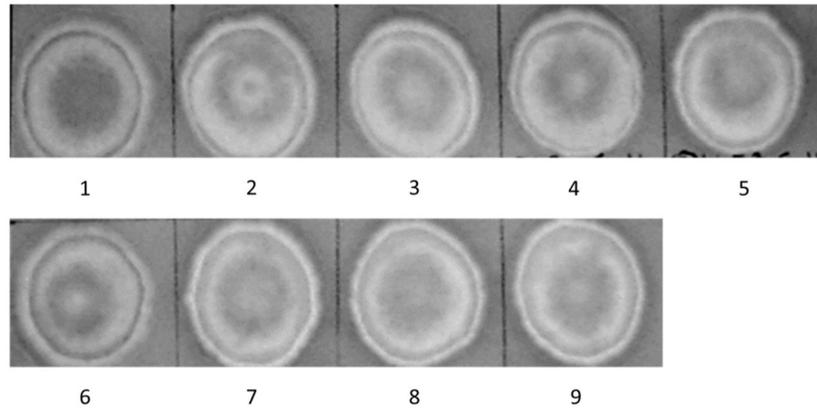


Figura 1.21. Esquema de la construcción desarrollada para la expresión en *Pseudomonas sp.* en base al vector pBBR1MCS y el gen codificante para Lip J2. Se indican las principales características del vector según la utilidad en este proyecto. En verde se muestra la inserción codificante para Lip J2 y el péptido “ABC minimal region”.

gen de Lip J2, y por fuera incluye la secuencia de corte para la proteasa TEV y la secuencia complementaria con el comienzo de la “ABC Minimal region”. De esta forma se obtuvo una secuencia que se denominó megaprimer Lip J2 y que se utilizó para llevar a cabo un clonado libre de enzimas de restricción, donde se utilizó como molde el vector pBBR1MCS-Lip I.3, y donde el gen codificante para Lip I.3 cuenta con la secuencia “ABC Minimal region” (Panizza et al., 2013). A partir de este vector y del megaprimer Lip J2 se obtuvo la construcción de interés (Figura 1.21), la cual fue transformada en una cepa de *E. coli* Top 10 para su multiplicación, obteniéndose la cepa AC XIX. La construcción desarrollada se envió a secuenciar a la empresa MacroGen, y pese a los múltiples intentos en ningún caso se consiguió un análisis de calidad suficiente que permitiera afirmar la identidad de la construcción.

Se realizó la transformación de la cepa *Pseudomonas* PAO1  $\Delta$ Lip con el vector pBBR1MCS Lip J2 para obtener la cepa recombinante productora de Lip J2 (AC XX), y también con el plásmido pBBR1MCS sin inserto para obtener una cepa control de expresión.



*Figura 1.22. Ensayo de actividad cualitativo utilizando MUF-butirato como sustrato. Muestra 1 control negativo (medio LB), muestra 2 clon 1, muestra 3 clon 2, muestra 4 clon 3, muestra 5 control positivo (lipasa A de Candida antarctica), muestra 6 clon control negativo de expresión, muestra 7 clon 4, muestra 8 clon 5, muestra 9 clon 6.*

A partir de los clones obtenidos se llevó a cabo el ensayo de expresión de la enzima de interés en las condiciones descritas en 1.3.3.2, se evaluó la actividad lipasa en el medio extracelular mediante el ensayo cualitativo utilizando MUF-butirato como sustrato, descrito en 1.3.2.2.

Como se observa en la *Figura 1.22* los clones ensayados presentaron actividad lipasa en estas condiciones, constatándose diferencia en la actividad expresada entre los clones ensayados y el control negativo del medio (muestra 1) o el clon control negativo de expresión (muestra 6), si bien este último mostró fluorescencia basal.

Adicionalmente se evaluó la expresión de proteínas extracelulares mediante PAGE-SDS, como se muestra en la *Figura 1.23*. Al comparar el perfil de proteínas extracelulares de los diferentes clones ensayados con el del control negativo de expresión, no se aprecia diferencia entre ellos, tampoco se aprecia una banda de peso molecular similar al esperado (52 kDa). Esta ausencia es concordante con la baja actividad observada en el ensayo cualitativo, y no permite concluir sobre la expresión extracelular de la enzima de interés, la que, si se estuviera expresando lo haría en muy baja cantidad para tratarse de un sistema de expresión heterólogo. Con el fin de corroborar que la ausencia de proteína en el medio extracelular pudiera obedecer a un error en la exportación de la misma debido a la falta de reconocimiento del motivo LARD, se evaluó la expresión intracelular. Se tomó una alícuota de células correspondientes a 20 mL de cultivo, se lisaron y se analizó el perfil de proteínas en la fracción soluble e insoluble mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes, no observándose ninguna banda de

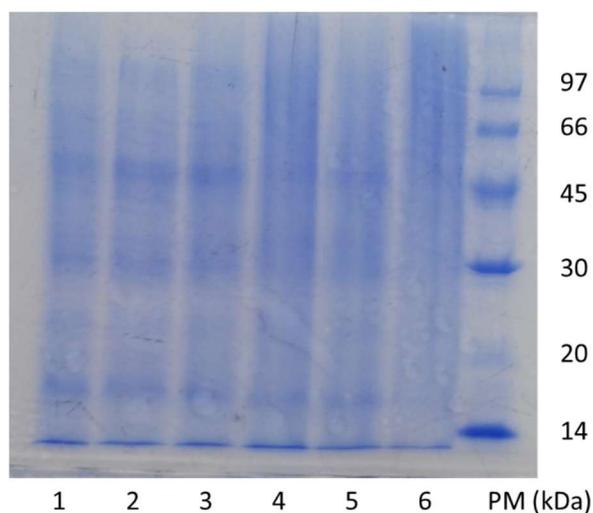


Figura 1.23. PAGE-SDS, gel homogéneo 12,5% tinción con Coomassie. Carril 1 control negativo de expresión, carriles 2 al 6 corresponden a los clones 1 a 5 respectivamente, PM (Low Molecular Weight Marker GE Healthcare).

peso molecular similar al esperado. El hecho de no observar expresión de Lip J2 en ninguna de las fracciones nos llevó a plantearnos si la preferencia de codones de la cepa de *Pseudomonas sp* utilizada era la adecuada para lograr la traducción del gen de interés, para lo cual no contamos con información detallada que nos permitiera analizarlo. La ausencia de expresión podría deberse a algún error durante la etapa de construcción del vector, lo cual no fue posible verificar debido a la mala calidad de las secuencias obtenidas. En base a estos resultados se concluyó que la expresión de Lip J2 mediante este sistema de expresión es escasa o nula, desestimándolo como alternativa al sistema desarrollado en *E. coli*.

Se decidió entonces explorar sistemas de expresión basados en microorganismos eucariotas, que si bien resultan más complejos a la hora del desarrollo también brindan ciertas ventajas a la hora de la expresión de proteínas. Para ello se seleccionaron cepas de *Pichia pastoris* y *Sacharomyces cerevisiae* las cuales han sido ampliamente estudiadas y han demostrado ser útiles para la expresión heteróloga de proteínas. Previo al desarrollo de estos sistemas, y debido a los inconvenientes suscitados en relación con la preferencia de codones de la cepa hospedera, se realizó el análisis de preferencia de codones para dichos microorganismos y se sintetizó el gen optimizado para su expresión en *S. cerevisiae* que tiene una preferencia de codones similar a *P.*

*pastoris*. El gen sintetizado presentó un CAI superior a 0,8 por lo que esto no debería ser un problema para la expresión de Lip J2 en dichos microorganismos.

#### 1.4.4.3 Expresión de Lip J2 a partir de sistemas basados en cepas de *Pichia pastoris*

Se diseñaron y desarrollaron tres sistemas de expresión comerciales basados en cepas de *Pichia pastoris*, PichiaPink, pPICZ $\alpha$  A y pGAPZ $\alpha$  A de la empresa Invitrogen™, pensados para la producción extracelular de proteínas recombinantes a gran escala.

El sistema de expresión PichiaPink consta de cuatro cepas que tienen suprimido el gen *ade2*, lo cual las hace auxótrofas para adenina; adicionalmente las cepas 2 y 3 tienen suprimida una proteasa extracelular, *pep4* y *prb 1* respectivamente; mientras que la cepa 4 tiene la doble delección. Por su parte el vector utilizado para el desarrollo del sistema contiene el gen *ade2*, dado que la inserción en el genoma de la cepa hospedera se da por recombinación homóloga, las cepas recombinantes complementarían dicha auxotrofia lo que facilita la selección de estas.

Para el desarrollo de cepas recombinantes que expresen LipJ2 basado en el sistema de expresión PichiaPink se construyó el vector que se muestra en la *Figura 1.24*. Para ello se partió de la cepa AC VII, se purificó el vector pUC 57-LipJ2 y mediante digestión con las enzimas de restricción Stu I y Kpn I se purificó el gen de Lip J2 optimizado para su expresión en *S. cerevisiae*. Similar tratamiento se realizó al plásmido pPINK $\alpha$  HC, de forma de obtener extremos complementarios al gen de interés, el cual fue insertado mediante ligación enzimática. La inserción se realizó en un sitio particular de forma que el gen de interés quedara precedido por la secuencia codificante para el factor de secreción  $\alpha$  y toda esta secuencia bajo la influencia del promotor inducible AOX 1. La construcción fue utilizada para transformar *E. coli* Top 10, seleccionando los

transformantes mediante la resistencia a ampicilina que les otorgó el vector (cepa ACIII). El paso de transformación en *E. coli* fue fundamental ya que permitió la multiplicación de la construcción de interés de manera sencilla, de forma de tener suficiente material para transformar las cepas del sistema PichiaPink. Previó a la transformación de las cepas de *P. pastoris* se realizó la linealización del vector mediante digestión con la

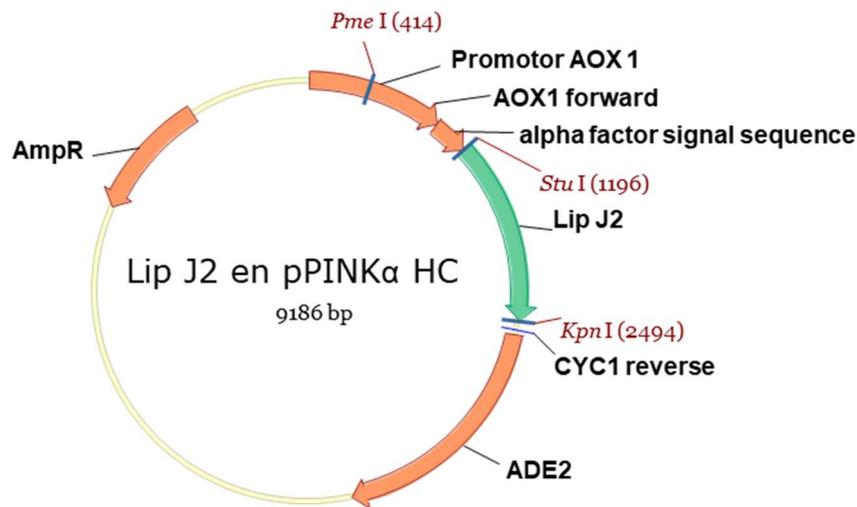
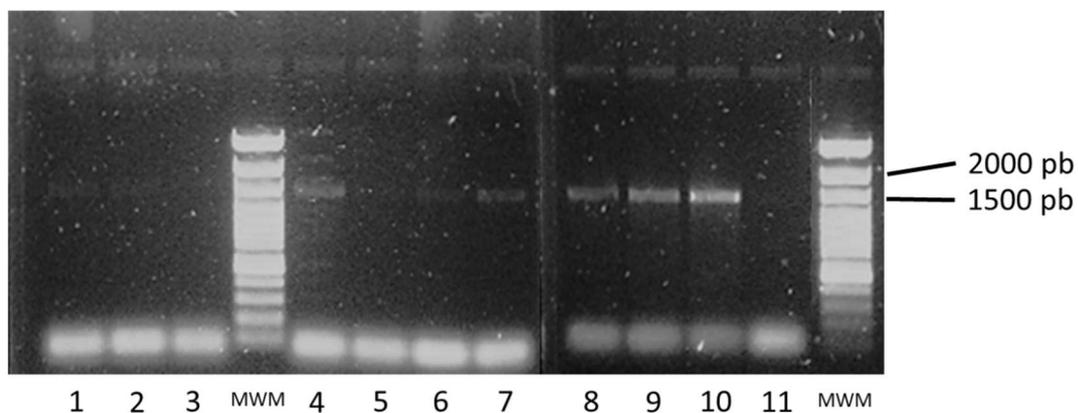


Figura 1.24. Esquema del vector Lip J2 en pPINK $\alpha$  HC, construido para el desarrollo de los mutantes del sistema de expresión PichiaPink.

enzima Pme I, con el fin de favorecer la recombinación de nuestra construcción con el ADN genómico de las cepas. La linealización con esta enzima no es la recomendada por el fabricante del sistema, sino una alternativa frente a casos como el nuestro dónde la enzima recomendada corta el gen de interés. De todas formas, la linealización favorecería la recombinación a nivel del promotor AOX1, reconstruyendo el promotor. La transformación se realizó por electroporación en las cuatro cepas competentes provistas en este sistema y se seleccionaron las cepas recombinantes. Esta selección se realizó en base a la auxotrofia para adenina de la cepa parental. Asimismo, el sistema permite distinguir las cepas que tuvieron múltiples eventos de recombinación. Estas últimas son de color blanco, indicando complementación total de la auxotrofia, mientras que las colonias correspondientes a bajo número de recombinaciones son de color rosado cuando son cultivadas en un medio carente de adenina por acumulación de intermediarios de las vías de las purinas. De la transformación se obtuvieron 19 cepas recombinantes, 10 correspondientes a la cepa PichiaPinK 1 y 9 correspondientes a la

cepa *PichiaPink* 3. A partir de las cepas obtenidas, se llevó a cabo la confirmación de la recombinación de la construcción de interés en el genoma, para ello se extrajo el ADN genómico y se realizó un ensayo de PCR utilizando los cebadores dirigidos a la zona *AOX 1* forward y *CYC 1* reverse indicadas en la *Figura 1.24*. En la *Figura 1.25* se muestra el resultado del ensayo confirmatorio para los mutantes de la cepa *PichiaPink* 1, visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa. Como se puede apreciar todos los mutantes excepto el 3 presentaron amplificación de una banda entre 1500 y 2000 pares de base, mientras que la amplificación esperada es de 1639 pares de base. Podemos afirmar que estos mutantes son positivos para la recombinación de la construcción Lip J2 en pPINK $\alpha$  HC.



*Figura 1.25. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carriles 1 a 10 corresponden a los respectivos mutantes de la cepa PichiaPink 1, carril 11 corresponde al control negativo de la PCR, MWM corresponde al marcador "GeneRuler 100bp plus DNA ladder"*

En la *Figura 1.26* se muestra el resultado del ensayo para los mutantes de la cepa *PichiaPink* 3, en este caso los mutantes 1 y 6 fueron negativos mientras que los restantes 7 mutantes fueron positivos para la inserción. Dado que muchos de los mutantes obtenidos fueron positivos para la inserción se procedió a realizar un ensayo rápido de expresión siguiendo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen, 2014).

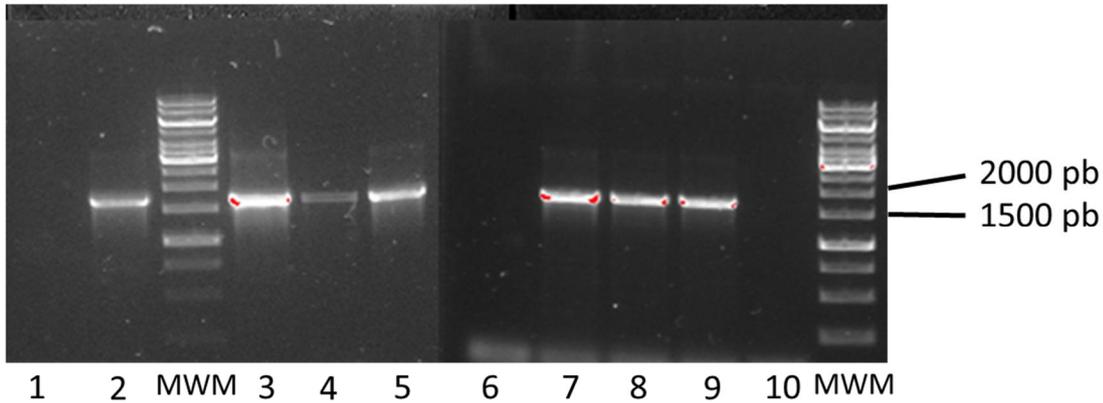


Figura 1.26. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carriles 1 a 9 corresponden a los respectivos mutantes de la cepa *PichiaPink 3*, carril 10 corresponde al control negativo de la PCR, MWM corresponde al marcador "GeneRuler 1kb DNA ladder"

Previo a ingresar al apartado de expresión de proteínas a partir de los mutantes desarrollados es importante contextualizar el proceso de metabolización del metanol por parte de *P. pastoris*. La metabolización del metanol se da dentro de los peroxisomas donde es oxidado en presencia de oxígeno, por la enzima alcohol oxidasa, produciendo formaldehído y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es metabolizado por la enzima catalasa que lo convierte en oxígeno y agua, detoxificando a la célula. El formaldehído por un lado es oxidado, aportando energía y equivalentes de reducción. Por otro, se condensa con xilulosa 5-fosfato, y la hexosa resultante es convertida en dihidroxiacetona y gliceraldehído fosfato, que son utilizados en forma anabólica para la síntesis de material celular. *Pichia pastoris* cuenta con dos enzimas alcohol oxidasa, las cuales están codificadas por los genes *AOX1* y *AOX2*, siendo la alcohol oxidasa 1 la responsable de más del 85 % de la actividad observada en las células. Como se puede apreciar en la *Figura 1.24* la construcción desarrollada para la obtención de los mutantes del sistema *PichiaPink* fue linealizada mediante el corte en el gen codificante para el promotor de la *AOX1*, esto implica que en caso de que la recombinación se de en forma correcta la cepa mantendrá la capacidad de metabolizar rápidamente el metanol (mut +), pero en caso de que la recombinación introduzca algún error en este gen, la capacidad de metabolizar metanol se verá reducida ya que la cepa dependerá exclusivamente de la alcohol oxidasa 2 (mut -). Que el mutante tenga el fenotipo sin

alteraciones luego del proceso de recombinación será determinante para la tasa de crecimiento de las cepas cuando el metanol sea la única fuente de carbono disponible, y la capacidad de inducir la expresión de Lip J2 mediante el agregado de metanol estará fuertemente afectada por esta variable (Invitrogen, 2014). Independientemente del fenotipo de los mutantes obtenidos es importante tener presente que cuando se cambia la fuente de carbono de glicerol o glucosa a metanol, las células requieren de un tiempo de adaptación durante el cual las células pueden no multiplicarse o incluso morir.

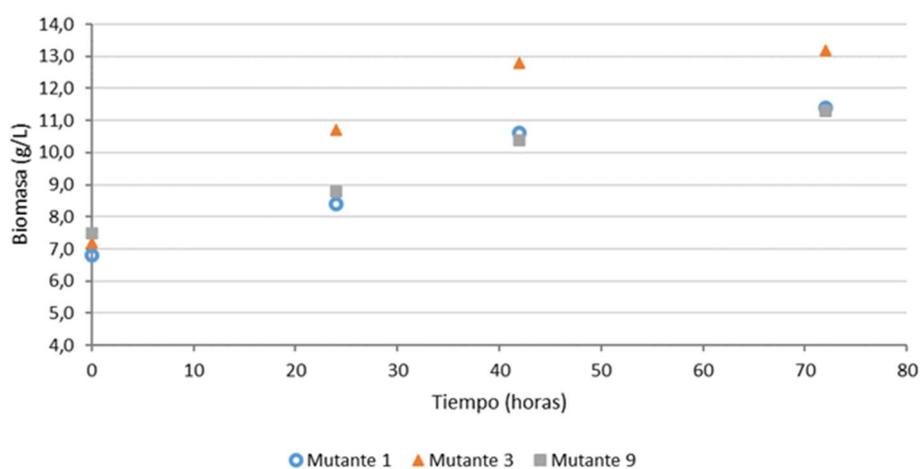
Todos los mutantes obtenidos fueron cultivados en tubos tipo Falcon en medio BMGY durante 24 horas, se centrifugaron y cada pellet fue resuspendido en medio BMMY, se incubaron en las mismas condiciones y cada 24 horas se tomó una alícuota de sobrenadante y se adicionó metanol hasta una concentración final de 16 g/L, este proceso se repitió durante tres días. A partir de la alícuota de sobrenadante se evaluó la actividad lipasa mediante el ensayo de actividad cualitativo utilizando MUF-butilato como sustrato (1.3.2.2), no constatándose actividad en ninguna de los recombinantes a ninguno de los tiempos evaluados. Este resultado, si bien negativo, era algo probable ya que la aireación lograda en este tipo de recipientes puede no ser suficiente para satisfacer la demanda de oxígeno necesaria en la etapa de oxidación del metanol a formaldehído, dado que en esta instancia es la única fuente de carbono, y esto repercute negativamente sobre la tasa de crecimiento y la expresión de Lip J2. Teniendo esto presente se decidió llevar la expresión de proteínas a una escala superior, en detrimento de la cantidad de clones ensayados teniendo que optar por el estudio de los mutantes correspondientes a una sola cepa. Se seleccionaron los recombinantes 1, 3 y 9 de la cepa Pichiapink 3 (AC XI), ya que esta cepa presenta como ventaja ser deficiente en una proteasa extracelular.

Se llevó a cabo el cultivo de los recombinantes 1, 3 y 9 de la cepa Pichiapink 3 en 75 mL de medio BMGY durante 24 horas, en las condiciones descritas por el fabricante, en matraces dentados de 500 mL, provistos de tapones permeables al oxígeno (Invitrogen, 2014).

Se centrifugaron los cultivos y los pellets se resuspendieron en medio BMMY, se alimentó el cultivo mediante el agregado de metanol a una concentración final de 10 mg/mL, se evaluó la biomasa obtenida cada 24 horas durante tres días post cambio de

fuente de carbono, mediante la determinación del peso seco de una alícuota de 2 mL de cultivo.

En la *Figura 1.27* se muestra la curva de crecimiento de los tres recombinantes evaluados en medio BMMY (metanol 10 mg/mL), los tres recombinantes presentaron un comportamiento similar, siendo capaces de crecer a partir de dicha fuente de carbono. La cepa 3 mostró mayor crecimiento, el cual no puede ser directamente atribuido a una característica inherente de la misma ya que no podemos asegurar que



*Figura 1.27.* Curva de crecimiento de los recombinantes de la cepa *PichiaPink 3*, utilizando metanol (10 mg/mL) como fuente de carbono. Evaluado mediante la determinación de peso seco.

las condiciones de aireación fueran exactamente idénticas entre los diferentes cultivos. En la *Figura 1.28* se muestra el resultado del mismo ensayo de crecimiento, alimentado con 16 mg/mL de metanol cada 24 horas, nuevamente los tres recombinantes fueron capaces de crecer en esta condición, y mostraron un comportamiento similar entre ellos. Del análisis derivado de los resultados expresados en las *Figuras 1.27* y *1.28* podemos inferir que los mutantes expresan correctamente la enzima alcohol oxidasa 1, por lo que la recombinación de la construcción de interés se dio de forma correcta. Al comparar el crecimiento en función de la concentración de metanol, queda en evidencia que se logra un mayor desarrollo de biomasa cuando el cultivo es alimentado con mayor concentración del alcohol.

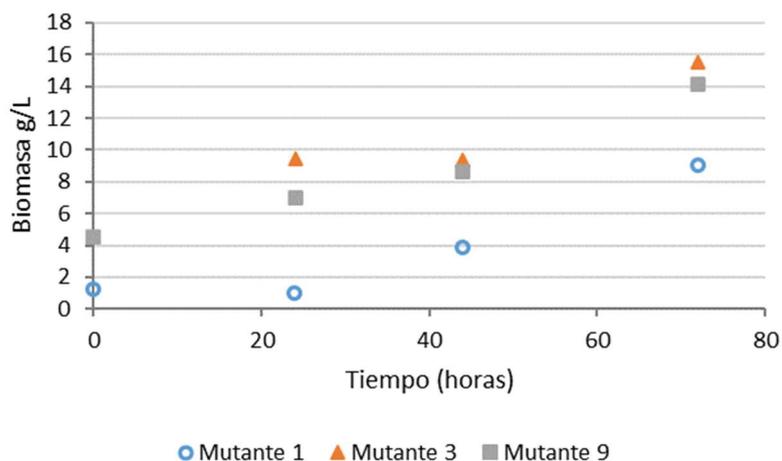


Figura 1.28. Curva de crecimiento de los recombinantes de la cepa *PichiaPink 3*, utilizando metanol (16 mg/mL) como fuente de carbono. Evaluado mediante la determinación de peso seco.

Se llevó a cabo un nuevo ensayo en donde además de variar la concentración de metanol con la que se alimentó los cultivos, se partió de una concentración de biomasa diferentes, con ello se buscó evaluar si la concentración inicial de biomasa fue un factor determinante para la diferencia en la tasa de crecimiento.

En la *Figura 1.29* se muestran los resultados del ensayo de crecimiento en matraces dentados, alimentando los cultivos con metanol a una concentración final de 10 mg/mL, en la misma se compara el crecimiento de los recombinantes 1, 3 y 9 de la cepa 3 del sistema *PichiaPink*, partiendo de diferente concentración inicial de biomasa. Cuando se partió de una concentración baja de biomasa (menor a 5 mg/mL) se apreció que los cultivos alcanzaron el doble de biomasa durante el tiempo transcurrido, cuando se partió de una concentración alta de biomasa (superior a 10 mg/mL) si bien no se duplicó la cantidad se logró un aumento mayor de la misma. Esto puede deberse a que la inhibición que causa el alcohol sobre el crecimiento celular se ve atenuada de forma más rápida por la mayor demanda de la fuente de carbono. Siguiendo esta línea de razonamiento se explica el comportamiento del mutante 3 iniciado a una concentración erróneamente elevada de inóculo, donde la cantidad de metanol suministrada al cultivo no es suficiente para satisfacer la demanda nutricional, comprometiendo el aumento de la cantidad de biomasa y la supervivencia del cultivo.

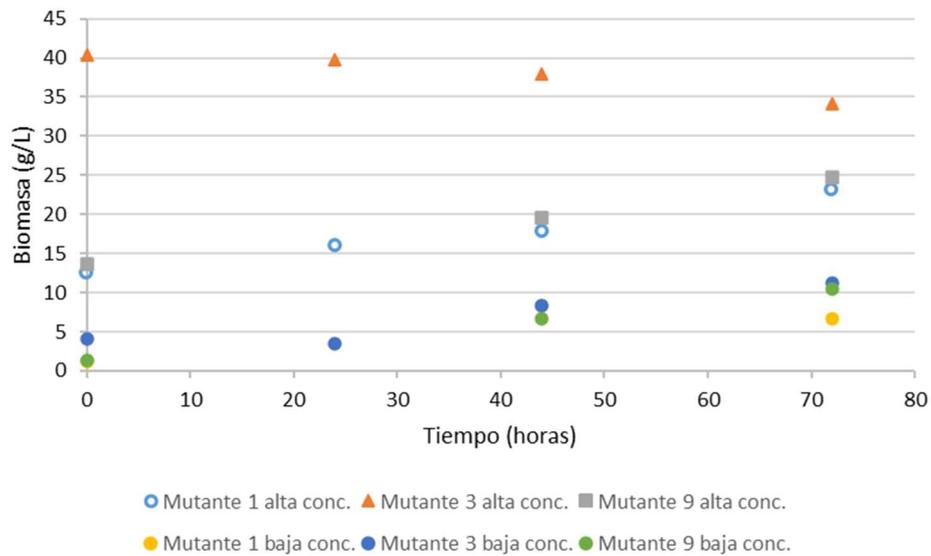


Figura 1.29. Curva de crecimiento de los mutantes 1, 3 y 9 de la cepa 3 del sistema *PichiaPink*. Cultivos realizados en Erlenmeyer, iniciados con baja y alta concentración de biomasa según el caso, alimentados con 10 mg/mL de metanol cada 24 horas.

En la *Figura 1.30* se muestra el comportamiento de los cultivos cuando fueron alimentados con metanol 16 mg/mL (concentración final), nuevamente se partió de dos condiciones diferentes de biomasa, baja y alta concentración. Los cultivos que partieron en condición de baja concentración de biomasa lograron triplicar la cantidad de biomasa

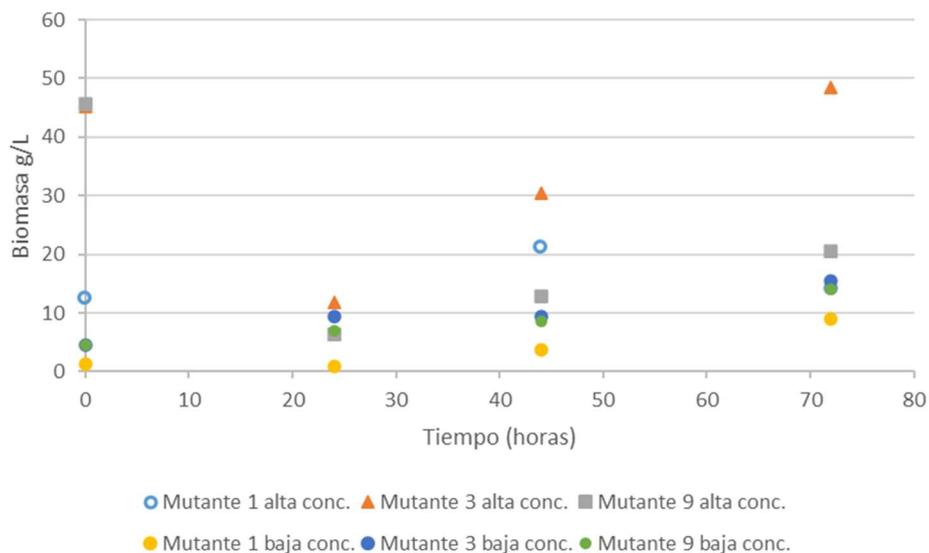


Figura 1.30. Curva de crecimiento de los recombinantes 1, 3 y 9 de la cepa 3 del sistema *PichiaPink*. Cultivos realizados en Erlenmeyer, iniciados con baja y alta concentración de biomasa según el caso, alimentados con 16 mg/mL de metanol cada 24 horas.

durante el tiempo ensayado cuando se alimentaron con metanol 16 mg/mL (concentración final). Los cultivos iniciados a partir de una concentración de biomasa alta mostraron un comportamiento diferente al observado hasta el momento, presentaron una pérdida de biomasa de aproximadamente el 80% luego de las primeras 24 horas, punto a partir del cual comenzó a crecer nuevamente con una tasa mayor a los cultivos que partieron con una concentración de biomasa baja. Esto puede deberse a que estos cultivos no se adaptaron rápidamente al cambio de la fuente de carbono y la adición de metanol provocó la muerte celular, o a que la aireación no haya sido suficiente (en los casos indicados) para metabolizar todo el metanol presente.

De estos ensayos se puede concluir que la cantidad de biomasa presente en el cultivo al momento del remplazo de la fuente de carbono determina la tasa de crecimiento durante las primeras horas de la alimentación. Siempre que la concentración de la fuente de carbono no limite el crecimiento es beneficioso partir de un cultivo de alta densidad celular, siendo la relación densidad celular/metanol un parámetro a analizar para cada caso, ya que como se observó los diferentes cultivos tienen una adaptación al metanol diferente.

En función de los resultados obtenidos hasta el momento se eligió el recombinante 3 de la cepa 3 del sistema PichiaPink para llevar a cabo el ensayo de crecimiento y producción de la enzima en fermentador de 2 litros. Para ello se utilizó el medio de cultivo descrito por (Cos, Resina, Ferrer, Montesinos, & Valero, 2005) el cual cuenta con glicerol como única fuente de carbono durante la etapa de crecimiento, pasadas 20 horas de cultivo se modificó la fuente de carbono a metanol. Se tomaron alícuotas del cultivo a diferentes tiempos, a las cuales se le analizó la cantidad de biomasa por peso seco, concentración de proteínas y la concentración de metanol. Se evaluó el estado metabólico de las células de forma indirecta mediante la determinación en tiempo real de la concentración de oxígeno disuelto a través de una sonda. Esta determinación permitió mantener cubierta la demanda de oxígeno durante todo el proceso, estableciendo límites para el parámetro en el software controlador del fermentador. A su vez interrumpir momentáneamente la alimentación con oxígeno permitió conocer el estado metabólico del cultivo, la disminución en concentración de oxígeno disuelto es indicativo de que esta metabólicamente activo, consumiendo glicerol o metanol; mientras que una concentración de oxígeno disuelto similar a la preestablecida indicaría

que no está consumiendo el glicerol durante la etapa de crecimiento o que no tiene metanol disponible durante la etapa de alimentación.

Se inició el cultivo en fermentador (Figura 1.31) con aproximadamente 25 g/L de biomasa fresca y se creció en medio mínimo con glicerol como única fuente de carbono, durante la fase de crecimiento en base a glicerol no se suministró oxígeno al cultivo ya que con el suministro de aire fue suficiente para cubrir la demanda de O<sub>2</sub>. Cuando comenzó a aumentar la concentración de oxígeno disuelto, se decidió comenzar la alimentación con metanol y suministrar oxígeno adicional. El primer pulso de metanol se calculó para que la concentración alcanzara 5 mg/mL, para evitar la pérdida de biomasa experimentada anteriormente para este mutante. Se observó que el recombinante consume el metanol a una velocidad menor a la esperada, por lo que se aplicaron pulsos de metanol para mantener la concentración en 1,0 mg/ml hasta que el cultivo demostró metabolizarlo a la velocidad esperada (hora 27 aproximadamente).

Dado el comportamiento anómalo observado, se decidió establecer un rango para el oxígeno disuelto dentro del cual se debía mantener el cultivo y en base a este se dosificó el metanol en forma automática, esto llevo a una alimentación de metanol tal que la concentración se mantuvo en el entorno de 4,7 mg/mL, durante las siguientes 17 horas (hora 43 aproximadamente). Finalmente, a las 44 horas se decidió dar un pulso de

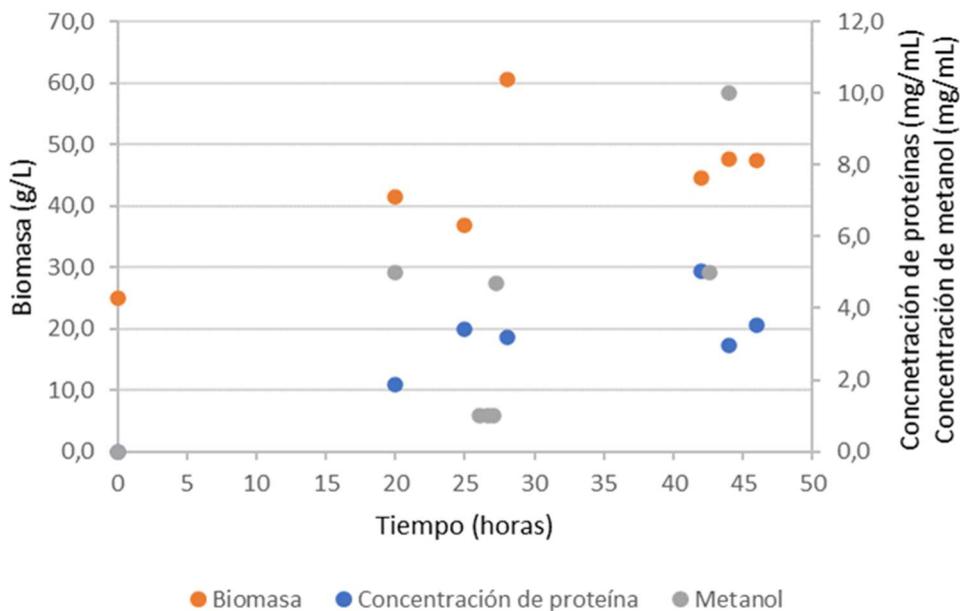


Figura 1.31. Curva de crecimiento del mutante 3 de la cepa 3 del sistema PichiaPink. Cultivo en fermentador realizado 2 etapas batch durante 20 horas, seguido por 28 horas de batch alimentado.

metanol de 10 mg/mL, el cual fue rápidamente metabolizado demostrando que el mutante es capaz de consumir la cantidad teórica de metanol esperable para el fenotipo mut +. A las 48 horas se decidió finalizar el cultivo, el cual fue centrifugado, conservándose el sobrenadante para analizar la expresión extracelular de la enzima de interés.

Al analizar los resultados de la fermentación queda en evidencia que el recombinante es capaz de metabolizar metanol, aunque al comienzo lo hace en concentraciones menores a lo esperado. Se mantuvo la concentración de metanol a un nivel bajo por precaución, pese a ello se logró duplicar la cantidad de biomasa en presencia de esta fuente de carbono y en paralelo se logró un aumento de la concentración de proteínas extracelulares, alcanzando una concentración final de 3,4 mg/mL.

El sobrenadante de cultivo de las 48 hs de crecimiento fue filtrado tangencialmente a través de una membrana de corte 10 kDa, para reducir el volumen de trabajo, y posteriormente se lo dializó frente a buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0 para completar la remoción de los componentes del medio de cultivo, finalmente la muestra se concentró 10 veces. Durante ambos procesos se constató la presencia de proteína precipitada, la cual fue removida por centrifugación para continuar con el análisis de la muestra.

La producción de proteínas durante el proceso de fermentación fue evaluada mediante PAGE-SDS como se muestra en la *Figura 1.32*, donde se puede apreciar que el perfil de expresión no varía a lo largo del cultivo, pero si aumenta la concentración de proteína como se había constatado previamente. Como se aprecia en los carriles correspondientes al sobrenadante de cultivo liofilizado la banda C tiene un peso molecular en el entorno del esperado para Lip J2, mientras que la banda A tiene un peso aproximadamente del doble, lo que podría corresponder a un agregado. Mientras que la banda B tiene un peso molecular aproximado al esperado si el factor alfa de exportación no fuera escindido. Por esta razón se enviaron a secuenciar mediante MALDI las tres bandas y se constató que las bandas A y C corresponden a proteínas propias de *Pichia sp.*, mientras que la banda B no mostro homología con LipJ2 ni con ninguna proteína depositada en base de datos.

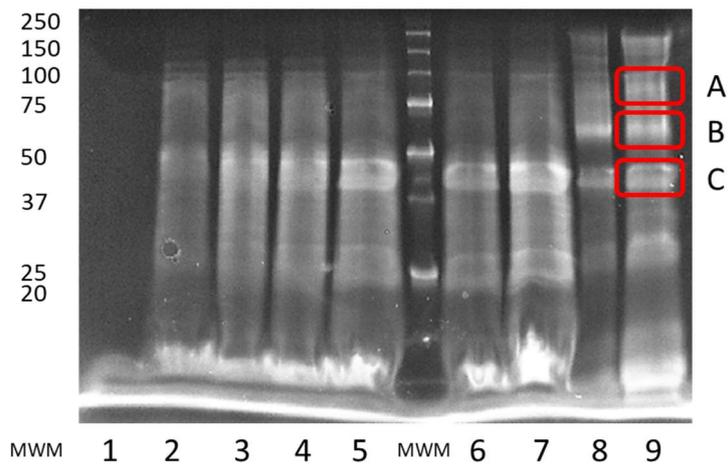


Figura 1.32. PAGE-SDS, gel mini-PROTEAN TGX stain free homogéneo 12%. Carril 1 al 7 corresponden al sobrenadante de cultivo en fermentador a tiempos 0, 20, 25, 28, 42, 44 y 46 horas respectivamente; carriles 8 y 9 corresponden al sobrenadante de cultivo ultrafiltrado, dializado y liofilizado a concentraciones de 33 y 100 mg de liofilizado/mL. MWM corresponde al marcador de peso molecular Precision Plus Protein unstained Estándar BIORAD). En rojo se indican las proteínas identificadas por MALDI

Esto nos indicaría que la cepa recombinante de *Pichia sp* no está produciendo LipJ2 en forma extracelular. Este resultado puede deberse a: una falla en la construcción del sistema que impide su expresión; que el péptido de secreción al medio extracelular no sea reconocido por lo que la proteína no es exportada fuera de la célula, o que la proteína quede retenida en la membrana durante el proceso de exportación.

Frente a las dificultades planteadas se decidió consultar con el Dr. Valero de la Universidad Autónoma de Barcelona, especialista en producción de enzimas en sistemas basados en *Pichia sp*. De este intercambio, surgió la idea de desarrollar otros sistemas de expresión basados en la cepa de *Pichia pastoris* X-33 (cepa silvestre) y los vectores comerciales pPICZ $\alpha$ A y pGAPZ $\alpha$ A, con los cuales ellos tienen amplia experiencia. Este cambio de cepa y de vectores busca disminuir las dificultades de cultivo y selección de los mutantes, y la variabilidad del consumo de la fuente de carbono a la hora de la inducción de la expresión de proteína. La cepa silvestre es sensible a Zeocina™, mientras que la inserción genómica de los vectores la hacen resistente a dicho antibiótico, por lo que la selección de los mutantes se realiza por resistencia y no por complementación de auxotrofia. Ambos vectores incluyen la secuencia codificante para el factor de secreción  $\alpha$ . El sistema pPICZ $\alpha$ A está diseñado para que la recombinación del vector ocurra en el locus del gen *AOX1*, por lo que si la recombinación es correcta los mutantes podrán

crecer en base a metanol y en caso contrario no podrán crecer, a la vez que esta fuente de carbono servirá como inductor de la expresión de la proteína ya que el gen de interés estará bajo la influencia del promotor de la AOX1. Por su parte el sistema pGAPZαA está diseñado para que la recombinación se de en el locus del promotor de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (pGAP) por lo que la expresión de la proteína de interés se dará de forma constitutiva.

En la *Figura 1.33* se muestran las construcciones desarrolladas para los nuevos sistemas de expresión. La inserción del gen de Lip J2 optimizado para su expresión en levaduras se realizó mediante el uso de las enzimas de restricción Kpn I y Not I en ambos casos, la misma se realizó de forma tal que el gen estuviera precedido por la secuencia codificante para el factor de secreción α en el extremo 5´ y la etiqueta de purificación HisTag en el extremo 3´. Ambas construcciones fueron transformadas en células de *E. coli* DH5α ya

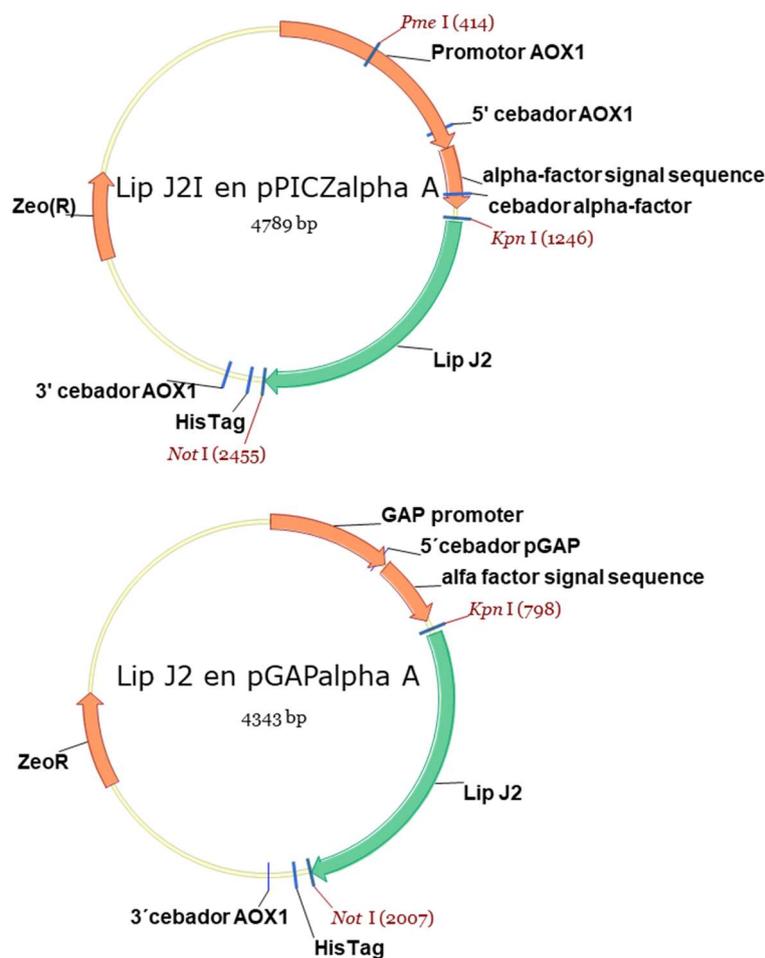
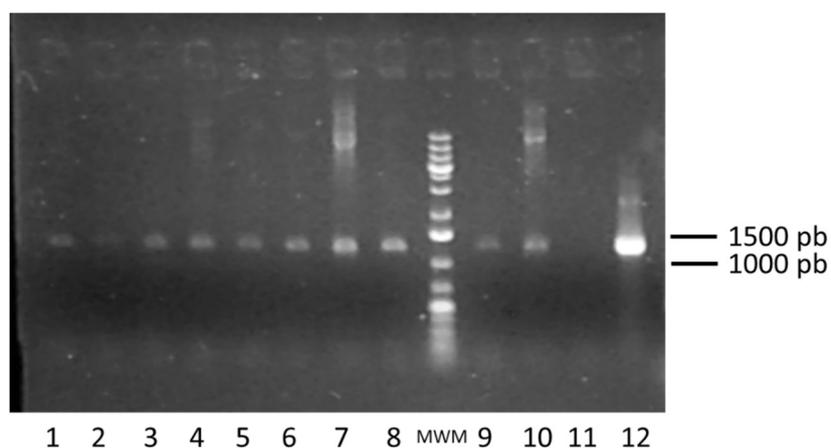


Figura 1.33. Vectores construidos en base a pPICZαA y pGAPZαA para el desarrollo de sistemas de expresión de Lip J2 basadas en la cepa *Pichia pastoris* X-33.

que éstas adquieren resistencia a Zeocina™ cuando son cultivadas en medio “*low salt media*”, los transformantes fueron seleccionados por la resistencia al antibiótico y almacenados como AC XIII y AC IV portando la construcción derivada de pPICZαA y pGAPZαA respectivamente (Invitrogen, 2010a, 2010b).

Siguiendo las recomendaciones del fabricante se llevó a cabo la transformación de la cepa X-33 de *P. pastoris* con las construcciones desarrolladas y se seleccionaron las cepas recombinantes mediante resistencia a Zeocina™, obteniéndose 91 mutantes para el sistema pPICZαA y 5 mutantes para el sistema pGAPZαA. La resistencia al antibiótico indica que la recombinación de las construcciones en el genoma fue efectiva. Adicionalmente se realizaron ensayos de PCR a partir de ADN genómico de los mutantes utilizando cebadores dirigidos a la secuencia de Lip J2; en la *Figura 1.34* se aprecia que todas las muestras ensayadas amplificaron una banda de tamaño similar al esperado para el gen de Lip J2 (1185pb), por lo que podemos afirmar que los recombinantes



*Figura 1.34. Gel de agarosa 0,8%. PCR confirmatoria de la presencia del gen de Lip J2 en los mutantes de la cepa X-33 de Pichia pastoris. Carriles 1 al 5 corresponden a los mutantes 1 al 5 del sistema pGAPZαA, carriles 6 al 10 corresponden a los mutantes 1 al 5 del sistema pPICZαA, carril 11 y 12 corresponden a los controles negativos y positivo de la PCR respectivamente, MWM corresponde a gen ruler 1kb plus.*

presentan la inserción de dicho gen. Con el fin de evaluar la posición donde se recombinó la construcción se llevaron a cabo ensayos de PCR a partir de ADN genómico de los recombinantes utilizando cebadores dirigidos a la secuencia 5'pGAP y 3'AOX1 para los mutantes del sistema pGAPZαA y 5'AOX1, y 3'AOX1 para los mutantes del sistema pPICZαA (ver *Figura 1.33*). El resultado esperado para dicha amplificación es una banda única de 1900pb mientras que los resultados obtenidos se muestran en la *Figura*

1.35, se puede apreciar para los mutantes del sistema pGAPZ $\alpha$ A se aprecia una banda de amplificación de tamaño superior a los 500 pb y otra banda de peso cercano a las 5000 pb; y que las muestras correspondientes a los mutantes del sistema pPICZ $\alpha$ A adicionalmente presentan una banda de amplificación de tamaño entre 1500 y 1700 pb. Los resultados obtenidos en estos ensayos son contradictorios, ya que por un lado se confirma la presencia del gen de Lip J2, pero la falta de amplificación cuando se utilizaron cebadores dirigidos al vector utilizado indica que la inserción no se dio en el lugar esperado.

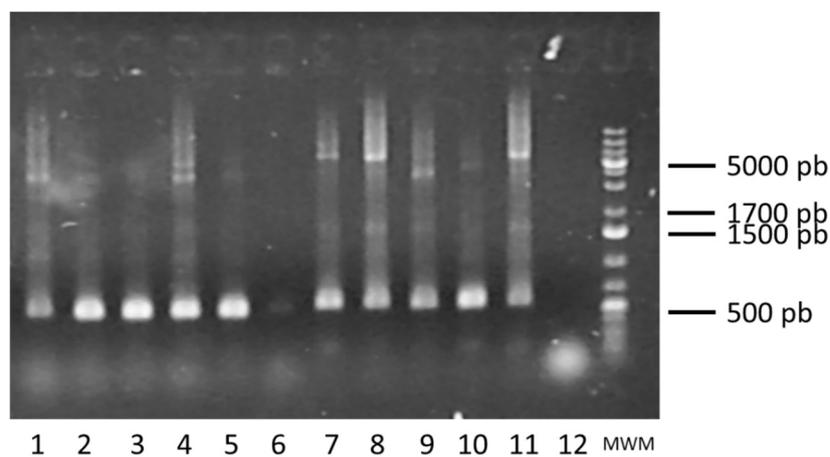


Figura 1.35. Gel de agarosa 0,8%. PCR confirmatoria de la presencia del gen de Lip J2 en los mutantes de la cepa X-33 de *Pichia pastoris*. Carriles 1 al 5 corresponden a los mutantes 1 al 5 del sistema pGAPZ $\alpha$ A, carriles 6 y 7 corresponden al control negativo de PCR, carriles 8 al 11 corresponden a los mutantes 1 al 5 del sistema pPICZ $\alpha$ A, MWM corresponde a gen ruler 1kb plus.

Con el fin de elucidar la posición donde se dio la inserción se enviaron a secuenciar (Macrogen Korea) las muestras de ADN genómico de los mutantes, con cebadores dirigidos a la secuencia del gen de Lip J2 que permitan el secuenciado de su entorno. Pese a los múltiples intentos de secuenciación, el largo de las secuencias obtenidas y la calidad de estas no fueron suficiente para obtener con certeza el entorno de la inserción del gen de interés. Los problemas de la secuenciación están relacionados con la combinación de los cebadores utilizados y el tamaño de la muestra a analizar. Los cebadores se diseñaron para secuenciar hacia afuera del gen de Lip J2, en una estrategia de *genome walking* en la cual fueron funcionales, mientras que la muestra a secuenciar fue ADN genómico de los recombinantes (S. Das et al., 2005). Las secuencias obtenidas

fueron de muy baja calidad, no permitiéndonos conocer el entorno donde se realizó la inserción de la secuencia de interés.

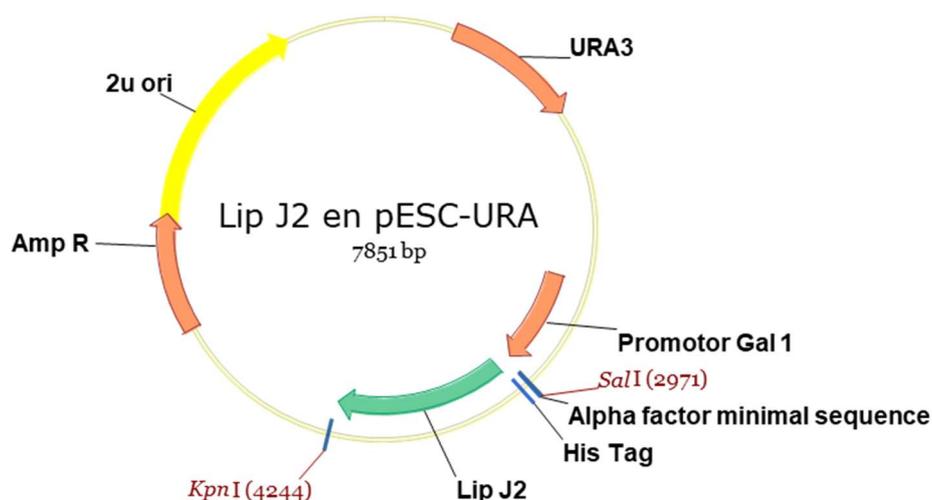
Pese a lo incierto de los resultados de caracterización molecular, se decidió llevar a cabo los ensayos de expresión, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen, 2010a, 2010b). Se crecieron los mutantes en medio BMGY suplementado con Zeocina™, desarrollándose según lo esperado para este tipo de mutantes. A partir de la biomasa obtenida se procedió a la expresión por sustitución de la fuente de carbono por metanol y galactosa, para los mutantes con la construcción pPICZαA y pGAPZαA respectivamente, con este cambio las cepas recombinantes fueron capaces de seguir creciendo. En esta oportunidad se evaluó mediante PAGE-SDS la expresión extracelular e intracelular, y dentro de esta última la fracción soluble e insoluble, no constatándose la presencia de bandas de peso molecular similar al esperado. Por lo que afirmamos que ninguno de los clones ensayados es productor de la enzima de interés.

Los sistemas basados en cepas de *P. pastoris* han demostrado ser útiles para la expresión de proteínas en cantidades superiores a los sistemas basados en *E. coli*; el desarrollo de estos sistemas de expresión si bien es conocido, resulta laborioso y está repleto de puntos clave que pueden ser determinantes del éxito. Sumado a esto, la etapa de expresión de la proteína de interés también cuenta con algunas variantes de difícil modulación como ser el cambio de fuente de carbono o el fino control de la aireación necesario para el crecimiento de las cepas inducidas con metanol. La imposibilidad de realizar la linealización de los vectores desarrollados utilizando la enzima recomendada por el fabricante como primera opción y las diferencias en el comportamiento metabólico de los mutantes desarrollados respecto a lo esperado nos llevó a no continuar trabajando sobre estos sistemas, ya porque no conocemos en detalle cuanto afectan las limitantes desde las que partimos en el éxito del proceso. Por ello se decidió redirigir nuestros esfuerzos al desarrollo de otro sistema de expresión basado en levaduras.

#### 1.4.4.4 Expresión de Lip J2 a partir de sistemas basados en cepas de *Sacharomyces cerevisiae*

Para el desarrollo de los sistemas de expresión en *S. cerevisiae* se seleccionó la familia de vectores pESC, en particular el pESC-URA de la empresa Agilent Technologies. Entre otras bondades, esta familia de vectores contiene los promotores Gal 1 y Gal 10 los cuales son inducibles por galactosa y se encuentran fuertemente reprimidos en presencia de glucosa, lo que permite separar en el tiempo la fase de crecimiento de la de expresión de enzima. Además, cuenta con un marcador de selección por auxotrofia, en este caso para uracilo, lo que permite la selección de los mutantes en determinadas condiciones, al utilizar cepas deficientes en el gen URA 3. Por esta razón se seleccionaron las cepas YPH 499 (cepa recomendada por el proveedor), y 15 C seleccionada por ser además deficiente en una proteasa extracelular.

Se desarrolló la construcción que se muestra en la *Figura 1.36*, como se puede apreciar el diseño se basó en el plásmido pESC-URA en el cual se insertó el gen de Lip J2 optimizado para su expresión en *S. cerevisiae* (sintetizado por Genescript) bajo la influencia del promotor *GAL 1*, precedido por la secuencia codificante para la etiqueta de purificación HisTag y la secuencia de secreción el Alpha factor minimal sequence ( $\alpha$ -factor). El ensamblado se llevó a cabo mediante PCR utilizando los cebadores fw 175C y rv 175D listados en la Tabla 1.3, la construcción se utilizó para transformar por

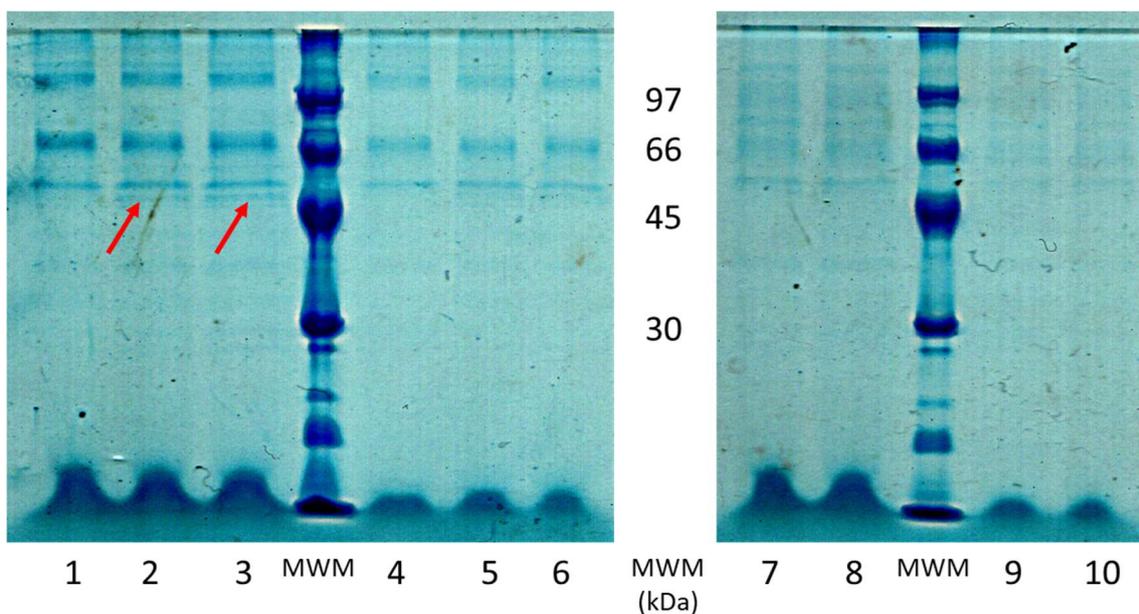


*Figura 1.36.* Vector pESC-URA -LipJ2 empleado en la construcción de los sistemas de expresión basados en cepas de *S. cerevisiae*. Se muestran las características más relevantes, gen de resistencia a ampicilina en bacterias, gen para complementar la auxotrofia de uracilo, promotor Gal 1 y el gen codificante para Lip J2.

electroporación células de *E. coli* Top10, seleccionando los por su resistencia ampicilina (cepa AC XXII).

La confirmación de la construcción se realizó mediante la amplificación con cebadores específicos para la secuencia insertada y genéricos dirigidos a regiones del vector utilizado, y su posterior secuenciación por parte de la empresa Macrogen. Se procedió a la transformación mediante electroporación de las cepas de *S. cerevisiae* YPH 499 y 15 C, se seleccionaron los transformantes por su capacidad de crecer en medio SD sin uracilo, los cuales se nombraron AC XXIII y AC XIV respectivamente.

A partir de las cepas desarrolladas se llevaron a cabo ensayos de expresión de proteínas, para ello se crecieron las cepas en medio YPGlucosa durante 24 horas, posteriormente se centrifugaron las células, se lavaron y se resuspendieron en medio YPGalactosa para inducir la expresión de Lip J2. Luego de 24 horas de inducción se centrifugaron los cultivos y se liofilizó el sobrenadante. El liofilizado se disolvió a una concentración de 200 mg/mL en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 8,0 y se evaluó la expresión mediante PAGE-SDS. En la *Figura 1.37* se pueden apreciar los resultados obtenidos para los diferentes clones evaluados de ambas cepas. Al analizar comparativamente los perfiles de expresión de los clones ensayados con sus respectivos controles negativos queda



*Figura 1.37. PAGE-SDS, gel homogéneo 12,5% tinción con Coomassie coloidal. Carril 1 control negativo de expresión cepa YPH 499, carriles 2 a 6 corresponden a los transformantes 1 a 5 de la cepa YPH 499 respectivamente, Carril 7 control negativo de expresión cepa 15C, carriles 8 a 10 corresponden a los transformantes 1 a 3 de la cepa 15C respectivamente MWM corresponde a Low Molecular Weight Marker GE Healthcare.*

manifiesto que solamente los transformantes 1 y 2 correspondientes a la cepa YPH 499 presentan una banda de proteína diferente (señalada en rojo). Este resultado si bien positivo, no demuestra una cantidad de proteína correspondiente a un ensayo de sobreexpresión. Adicionalmente se evaluó la expresión intracelular de proteínas y luego de la comparación de los perfiles de expresión de los transformantes ensayados con su respectivo control, podemos afirmar que no hubo ninguna banda de peso molecular similar al esperado para Lip J2 ni en la fracción soluble ni en la insoluble.

Para corroborar la presencia de Lip J2 en el sobrenadante de cultivo, se ensayó la purificación de la banda de interés por medio de IMAC en columna HisTrap 1 mL cargada con cobre según el protocolo descrito por el fabricante (Sepharose et al., n.d.), a partir de 30 mL de sobrenadante de cultivo del transformante 2 de la cepa YPH 499. El proceso se evaluó mediante PAGE-SDS ya que la banda de interés era minoritaria como para ser estimada mediante la medición de absorbancia a 280 nm. Se evaluaron la muestra aplicada, el percolado, los lavados y los eluidos. El perfil de bandas del aplicado y el percolado fue idéntico, no observándose ninguna banda en el carril correspondiente a los eluidos. Este resultado puede estar indicando que la banda observada en la *Figura 1.38* es un artefacto o que la etiqueta de purificación utilizada, al ser incluida en el extremo amino terminal de la proteína en interés, no esté disponible para interactuar con la matriz durante el proceso de purificación debido al plegamiento de la enzima o a su posible glicosilación ya que *S. cerevisiae* hiperglicosila.

En paralelo se buscó explicación de la baja expresión observada, la hipótesis que cobró mayor fuerza fue que la falta de presión selectiva durante el cultivo lleve a una pérdida del material genético insertado en las cepas. Es de resaltar que, en contraste con las construcciones realizadas en *Pichia*, los vectores de expresión desarrollados para *S. cerevisiae* se mantienen en forma episomal, con lo cual su pérdida por segregación generacional es posible. Para corroborar esta hipótesis se realizó el estudio de retención del plásmido explicado en la sección 1.3.3.4. Los resultados del ensayo para ambas cepas se muestran en la *Tabla 1.8*. Como se puede apreciar cuando se cultivan las cepas en ausencia de presión selectiva, el porcentaje de retención del plásmido es aproximadamente del 25% para ambas cepas, mientras que cuando lo hacemos en un medio con presión selectiva la retención es casi total.

El estudio comparativo de la producción de biomasa en ambos medios deja clara evidencia que se alcanza mayor crecimiento cuando los mutantes son cultivados en medio rico.

Tabla 1.8 Estudio de retención de plásmido para las cepas YPH 499 y 15 C

Cepa		Medio YPD	Medio SD
YPH 499	% de retención	23	99
	DO <sub>600</sub>	6,6	1,1
15C	% de retención	28	99
	DO <sub>600</sub>	4,2	1,0

Frente a estos resultados podemos decir que el bajo porcentaje de retención del plásmido puede ser una causa de la baja cantidad de proteína observada en la PAGE-SDS de los ensayos de expresión. Como alternativa se podría realizar todo el proceso en medio de cultivo con presión selectiva para forzar a los mutantes a retener el plásmido, pero se descartó dado que la baja cantidad de biomasa obtenida en dicho medio también afectaría al bajo rendimiento de la producción de proteína, además de ser una alternativa costosa.

Debido a la baja expresión obtenida en ausencia de presión selectiva durante el proceso de cultivo e inducción y a la incapacidad para llevar a cabo la purificación a través de la etiqueta incluida para tal fin, podemos decir que los sistemas desarrollados en base a cepas de *Sacharomyces cereviseae* no son una alternativa viable para brindarnos la cantidad de proteína que requerimos para el objetivo propuesto.

## 1.5. Conclusiones del capítulo

En el presente capítulo se partió de una cepa productora de lipasas extracelulares, con potencial en la síntesis de biodiesel, enfocándose el trabajo en la purificación e identificación de la lipasa responsable de esta actividad, así como el desarrollo de un sistema de producción para la misma. La aproximación clásica seguida para la purificación e identificación de la o las lipasas a partir de la cepa nativa de *Janibacter* R02 encontró diversos inconvenientes. Paralelamente, la estrategia molecular desarrollada en el grupo de trabajo aportó datos suficientes para la identificación de una potencial lipasa denominada LipJ2. En virtud de las dificultades asociadas a la producción de las enzimas en la cepa nativa, probablemente asociado a la concomitante expresión de proteasas, se decidió desarrollar un sistema de expresión heterólogo para esta proteína.

Con el objetivo de encontrar un sistema de expresión que permitiera la expresión de la proteína de interés en forma soluble se estudiaron un amplio rango de hospederos, condiciones y estrategias de expresión, los cuales se resumen en la Tabla 1.9. Sin embargo, el sistema de expresión que posibilitó la obtención de una gran cantidad de la lipasa objetivo fue el desarrollado en base al plásmido pET 22b+ y la cepa de expresión *E. coli* BL21 (DE3), y del gen de Lip J2 optimizado para su expresión en dicho hospedero. Este sistema muestra una muy alta producción de la enzima objetivo, no obstante, la misma se produce como cuerpo de inclusión. En el capítulo 2 se presentará la purificación de la misma a partir de cuerpos de inclusión, así como su caracterización.

Cepa	Vector	Verificación de la construcción	Estudios de expresión	Resumen de conclusiones
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET-22b (+)	PCR ✓ Secuenciado ✓	Page-SDS ✓ Actividad (na)	Posible no expresión por preferencia de codones
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET-22b (+)	PCR ✓ Secuenciado ✓	Page-SDS ✓ Actividad (na)	Optimización de codones. Expresión en cuerpos de inclusión.
<i>P. aeruginosa</i> PAO1ΔLipH	pBBR1MCS	PCR ✓ Secuenciado X	Page-SDS ✓ Actividad ✓	No se apreció sobreexpresión. El SNC de los transformantes muestra actividad lipasa.
PPink 1	PPINKαHC	PCR ✓ Secuenciado X	Page-SDS ✓ Actividad X	No fue posible confirmar la inserción mediante secuenciado debido a la baja calidad del secuenciado. Los transformantes tienen genotipo mut +. No se observó sobreexpresión en ninguna de las fracciones analizadas.
PPink 3	PPINKαHC	PCR ✓ Secuenciado X	Page-SDS ✓ Actividad X	No fue posible confirmar la inserción mediante secuenciado debido a la baja calidad del secuenciado. Los transformantes tienen genotipo mut +. No se observó sobreexpresión en ninguna de las fracciones analizadas.
<i>P. pastoris</i> X-33	pPICZα A	PCR ✓ Secuenciado X	Page-SDS ✓ Actividad X	No fue posible confirmar la inserción mediante secuenciado debido a la baja calidad del secuenciado. Los transformantes crecen en base a metanol. No se observó sobreexpresión en ninguna de las fracciones analizadas.
<i>P. pastoris</i> X-33	pGAPZα A	PCR ✓ Secuenciado X	Page-SDS ✓ Actividad X	No fue posible confirmar la inserción mediante secuenciado debido a la baja calidad del secuenciado. No se observó sobreexpresión en ninguna de las fracciones analizadas.
<i>S. cerevisiae</i> YPH 499	pESC-URA	PCR ✓ Secuenciado ✓	Page-SDS ✓ Actividad X	Se aprecia expresión. No fue posible purificar mediante IMAC.
<i>S. cerevisiae</i> 15C	pESC-URA	PCR Secuenciado ✓	Page-SDS ✓ Actividad X	No se observó expresión.

Tabla 1.9. Resumen de ensayos y resultados obtenidos a partir de los sistemas de expresión desarrollados

Significa que la tarea fue realizada y el resultado obtenido fue el esperado y concluyente.

X Significa que la tarea fue realizada, y el resultado no fue concluyente.



## Capítulo 2

---



## Capítulo 2. Purificación a partir de los cuerpos de inclusión y caracterización bioquímica de Lip J2

### 2.1. Introducción

#### 2.1.1. Los cuerpos de inclusión, tropiezo y recompensa

El desarrollo de sistemas de expresión heterólogos de enzimas es solo uno de los pasos necesarios para enfrentar la baja producción de la enzima de interés a partir del microorganismo silvestre. Una vez desarrollado un sistema efectivo para la expresión se debe afrontar la purificación de la proteína en cuestión, proceso que puede ser parcialmente resuelto durante la etapa del diseño del sistema de expresión mediante la inclusión de etiquetas de purificación como se explicó en el capítulo anterior. Previo a la etapa de purificación se debe analizar el tipo de expresión obtenida, ya que la misma puede dar lugar a la enzima de interés en forma soluble, o puede que la expresión se de en forma insoluble, bajo la forma de cuerpos de inclusión (CI). Los casos donde la expresión sea en forma soluble, será posible avanzar hacia las etapas de purificación sin mayor inconveniente, sin embargo, este panorama es el menos frecuente. Generalmente los diferentes microorganismos procariotas hospederos utilizados para el desarrollo de sistemas de expresión heteróloga suelen producir las proteínas de interés bajo la forma de CI. A modo de ejemplo, entre el 40 y 80 % de las proteínas que se ha intentado sobre expresar en *E. coli* lo han hecho bajo la forma de CI (Buchner, Pastan, & Brinkmann, 1992; Singhvi, Saneja, Srichandan, & Panda, 2020; Slouka, Kopp, Spadiut, & Herwig, 2019).

Los cuerpos de inclusión son una estructura insoluble, muy estable, resistente a las condiciones ambientales como pH y temperatura, así como a la degradación por proteasas, están constituidos mayormente por la proteína de interés (85 a 90%). El principal inconveniente de los CI es que la proteína de interés se encuentra agregada pudiendo presentar problemas de plegamiento los cuales afectan total o parcialmente su estructura, y su solubilidad (Baneyx & Mujacic, 2004; García-Fruitós et al., 2012; He & Ohnishi, 2017; Singhvi et al., 2020). Sin embargo, no debe verse a los CI necesariamente como un defecto en el proceso de producción, sino considerarlos como una posible estrategia de purificación.

La solubilidad de las enzimas debe entenderse como la consecución del plegamiento exitoso en forma nativa, lo que además le confiere su actividad biológica, por lo que la mayor parte de las moléculas de enzima que constituyen los CI son inactivas (Baneyx & Mujacic, 2004). Diferentes autores apuntan que la expresión desmedida de proteínas en sistemas basados en *E. coli* conduce a la formación de CI. Pese a ello actualmente la producción de aproximadamente el 40% de los biofármacos se lleva a cabo en sistemas de expresión basados en dicho microorganismo, ya que existen estrategias que permiten modular la agregación proteica, evitando la formación de los CI, o incluso utilizando los CI como un paso en el proceso de purificación (García-Fruitós et al., 2012; S. K. Gupta & Shukla, 2017; Valax & Georgiou, 1993).

Frecuentemente la producción de proteínas bajo la forma de CI en *E. coli* se debe a que la tasa de expresión es demasiado alta para las células, excediendo la capacidad del hospedero para manejar el correcto plegamiento de la proteína expresada. La elevada velocidad de expresión no permite que se den las interacciones intracatenarias necesarias para lograr el correcto plegamiento (puentes de disulfuro, interacciones entre grupos cargados e interacciones hidrofóbicas entre aminoácidos), o incluso favorece la interacción intercatenarias lo que conduce directamente al mal plegamiento de las proteínas (Buchner et al., 1992; Gill, Valdes, & Bentley, 2000; Zeng & Yang, 2019). Además cabe recordar que los sistemas basados en *E. coli* (organismo procarionta) no realizan modificaciones postraduccionales de las proteínas que produce, lo cual también actúa en detrimento de la solubilidad (Baumgarten, Ytterberg, Zubarev, & de Gier, 2018; Walsh, 2010).

La coexpresión de proteínas chaperonas, la utilización de sistemas de expresión extracelular (en el periplasma), o cepas que promuevan la formación de puentes de disulfuro han demostrado cierta tasa de éxito para evitar la expresión insoluble de algunas proteínas en *E. coli*, pero ha estado ligado a grupos de proteínas objetivo y su reproducibilidad ha sido baja (Baumgarten et al., 2018; García-Fruitós et al., 2012; W. Zhang et al., 2018). Dado que la formación de los cuerpos de inclusión se ve aumentada por la elevada concentración de la proteína que se está expresando, disminuirla es la primera alternativa para evitar la formación de los CI. Para ello existen diferentes estrategias como la utilización de promotores no inducibles, disminución de la

concentración del agente inductor de la expresión, modificaciones de la temperatura de inducción, entre otras (Castellanos-Mendoza et al., 2014; Donovan, Robinson, & Click, 1996; Y. E. Kim, Hipp, Bracher, Hayer-Hartl, & Ulrich Hartl, 2013; Restrepo-Pineda, Bando-Campos, Valdez-Cruz, & Trujillo-Roldán, 2019; Winkler et al., 2010).

Una vez agotadas las alternativas para modular las condiciones de expresión, sin éxito, es el momento de aceptarlos como una ventaja para la purificación. Los CI están constituidos mayoritariamente por la proteína de interés, que durante la agregación retiene otras macro biomoléculas del hospedero (Krachmarova, Ivanov, & Nacheva, 2020; Rinas & Bailey, 1992; Valax & Georgiou, 1993). Visto de otra forma, la proteína de interés se encuentra aislada de las demás proteínas del hospedero, por lo que la formación de cuerpos de inclusión es un método de purificación en sí mismo. Sin embargo, se presentan algunos desafíos para obtener moléculas discretas de enzima, i) separar los CI de los demás componentes celulares, ii) solubilizar los CI, iii) replegar la enzima de interés en su conformación nativa y iv) purificar la enzima de interés.

La separación de los CI del resto de las proteínas puede ser fácilmente lograda mediante centrifugación ya que, por su densidad, los CI se mantendrán con los restos celulares luego de la disrupción celular. Para lograr la separación de los restos celulares se aplica generalmente DNAsa para digerir los ácidos nucleicos, Tritón X-100 para solubilizar los lípidos de membrana y NaCl para solubilizar posibles proteínas contaminantes (Peternel, 2013). Sin lugar a duda los puntos más desafiantes son la solubilización de los cuerpos de inclusión y desnaturalización de la proteína, y la renaturalización de la enzima de interés. Para estas tareas no existe un protocolo universal, o algoritmo que anticipe el comportamiento de los CI frente a los diferentes agentes solubilizantes/desnaturalizantes. Como regla general deben buscarse las mínimas condiciones en las que se logre la desnaturalización de la enzima.

Generalmente la desnaturalización de la proteína de interés se lleva a cabo mediante el agregado de agentes desnaturalizantes fuertes como urea (8M), cloruro de guanidina (6M) o SDS, acompañados de pH extremos (ácidos o básicos). Además, se debe incluir un agente reductor para mantener las cisteínas reducidas y evitar la formación de puentes de disulfuro, generalmente el elegido es ditioneitol (DTT), además en estos casos suele incluirse el par glutatión reducido-glutatión oxidado. En caso de que la

proteína tenga un átomo metálico asociado a su estructura también debe incluirse EDTA para quelar dicho metal (Buchner et al., 1992; Clark, 2001; Fischer, Sumner, & Goodenough, 1992; Vallejo & Rinas, 2004).

Para lograr la renaturalización de la enzima de interés se deben tener en cuenta dos cosas, la primera es la remoción de los agentes desnaturizantes de forma que se permita paulatinamente el replegamiento de la enzima, y la segunda es considerar que la formación de los CI se debe en gran medida a la elevada concentración de proteína producida, por lo que es necesario que el volumen de solución en la que se obtenga la proteína de interés sea lo suficientemente grande para evitar la interacción entre moléculas. La remoción de los agentes desnaturizantes puede realizarse mediante diversas estrategias, algunas de las más frecuentes son: i) diálisis, se dializa la solución conteniendo a la proteína desnaturizada contra buffer de desnaturización al cual se le disminuye paulatinamente la concentración de agentes desnaturizantes; ii) dilución reversa, agregando buffer de renaturalización en cantidad suficiente para que la concentración de agentes desnaturizantes presentes en la muestra deje de cumplir su cometido. Este método presenta como gran desventaja que la concentración de proteína es elevada en el momento que comienza a darse el replegamiento, iii) dilución instantánea, consiste en agregar, en forma abrupta, la solución de proteína desnaturizada al buffer de replegamiento, de forma que la concentración de los componentes de la solución de partida disminuya instantáneamente más de 50 veces; iv) dilución por goteo, este método consiste en realizar un goteo de la solución conteniendo la proteína desnaturizada, sobre un volumen suficientemente grande de buffer de replegamiento, de forma tal que cuando la gota es mezclada la concentración de los agentes desnaturizantes tiende a 0. El goteo debe realizarse de forma muy lenta de forma que la proteína contenida en cada gota tenga tiempo suficiente de replegarse. Además de estos métodos se han descrito otros en donde el replegamiento se realiza en columna, mediante la adsorción de la proteína de interés a una matriz por la que presente afinidad, si bien existen casos de éxito, estas técnicas no son aplicables a cualquier proteína, ya que requieren de la presencia de una etiqueta de afinidad (Buchner et al., 1992; Clark, 2001; Katoh & Katoh, 2000; Lillie, Schwarz, & Rudolph, 1998; Singhvi et al., 2020; Varnerin et al., 1998; West, Chaudhuri, & Howell, 1998).

Un punto clave para el éxito del replegamiento son las condiciones en las que se lleva a cabo el proceso, las cuales afectan el plegamiento. La temperatura es un parámetro fundamental ya que en la mayoría de los casos se logran mayores tasas de renaturalización a bajas temperaturas, dado que la velocidad de plegamiento aumenta conforme lo hace la temperatura. Esto hace que el plegamiento sea más propenso a errores que conducen a estructuras no nativas, poco estables y/o biológicamente inactivas. La composición de buffer de replegamiento también es determinante en el proceso, muchas proteínas tienen cisteínas que pueden o no formar puentes de disulfuro, en muchos casos la formación de un puente de disulfuro, incluso uno correcto limita el correcto plegamiento de la proteína, por lo que incluir un sistema redox adecuado es de gran utilidad. Uno de los más aplicados es el par glutatión oxidado-glutatión reducido (GSSG/GSH), la presencia de estos compuestos permitirá la formación y ruptura de los puentes de disulfuro que se forman durante el proceso de replegamiento, permitiendo que la proteína se pliegue en su conformación nativa. Una vez que se alcanza la conformación nativa, la oxidación de las cisteínas se puede dar exponiendo la solución al aire (Chatrenet & Chang, 1992; Manta, Boyd, & Berkmen, 2019; R. R. Singh & Appu Rao, 2002; Vallejo & Rinas, 2004). Evitar la interacción proteína-proteína es otro de los aspectos importantes para el correcto plegamiento, para ellos se pueden incluir en el buffer componentes que minimicen la agregación. La adición de algunos aminoácidos como la arginina disminuye la agregación entre moléculas de proteína, aunque no se conoce exactamente el mecanismo mediante el cual actúa. Sin embargo la utilización de ésta, no es inocua, ya que interfiere en posibles pasos posteriores de purificación que incluyan cromatografías de intercambio iónico o de afinidad con metales inmovilizados, impidiendo la adsorción a la matriz en el primer caso y liberando los metales de la columna en el segundo (Abe, Kudou, Tanaka, Arakawa, & Tsumoto, 2009; Arakawa et al., 2007; Baynes, Wang, & Trout, 2005; U. Das et al., 2007; Futatsumori-Sugai et al., 2009; Misawa, 1999; Rudolph & Martin-luther-universitdt, 2018).

### 2.1.2. Lipasas extremófilas

Como se mencionó en el capítulo 1, en el desarrollo de nuevos bioprocesos o sustitución de actuales procesos químicos por biocatalíticos, la búsqueda de nuevas enzimas en conjunto con la ingeniería de los bioprocesos son la clave para el éxito. Las lipasas extremófilas son un grupo de enzimas que tienen características bioquímicas muy deseables. Se consideran enzimas extremófilas aquellas que tienen gran actividad o estabilidad en condiciones ambientales extremas. Las extremoenzimas están muy relacionadas con los microorganismos extremófilos, por lo que muchas enzimas que son termofílicas o psicofílicas, provienen de microorganismos termófilos o psicrófilos. Sin embargo, no podemos generalizar, ya que no todas las enzimas aisladas de extremófilos presentan características extremofílicas y viceversa (Raddadi, Cherif, Daffonchio, Neifar, & Fava, 2015).

Existen muchas ventajas a nivel industrial por llevar adelante procesos a temperaturas elevadas, entre las más importantes se encuentran el aumento de la tasa de reacción, reducción de la contaminación microbiana por microorganismos mesófilos y aumento de la solubilidad y difusión de los reactivos. Las enzimas termofílicas son una herramienta interesante y eficiente para este tipo de procesos. En el extremo opuesto se encuentran las enzimas psicofílicas, eficientes a bajas temperaturas, ideales para procesos que incluyan componentes termolábiles, o en el desarrollo de procesos alimentarios donde el aumento de la temperatura altera las propiedades organolépticas del alimento (López-López, Cerdán, & González Siso, 2014; Sahay & Chouhan, 2018).

De forma análoga existen las extremoenzimas que funcionan en condiciones drásticas de pH. Las lipasas particularmente tienen su pH óptimo dentro del rango de pH 6 a 10 debido a su mecanismo catalítico. Las lipasas estables a pH alcalinos son deseadas en la industria de los detergentes al que se incorporan como agentes desengrasantes, ya que los ácidos grasos producidos son más solubles en condiciones básicas. Mientras que las lipasas acidófilas han sido poco estudiadas debido a su escasa existencia (Panizza et al., 2013; Sethi, Nanda, & Sahoo, 2016).

Las lipasas halofílicas por su parte son estables a concentraciones elevadas de sales. Se ha observado que las mismas características estructurales que aumentan la estabilidad en presencia de concentraciones elevadas de sales, son las que proveen estabilidad en

condiciones de baja actividad de agua e incluso en presencia de solventes orgánicos. Lo que hace a este grupo de enzimas muy interesante para ser aplicadas en el área de la química fina y la industria farmacéutica (Christopher et al., 2014; Pérez et al., 2012, 2011; Raddadi et al., 2015).

Desde el punto de vista estructural no se han encontrado modificaciones significativas en los motivos proteicos de lipasas extremofílicas respecto a las mesofílicas. Lo que si se aprecia en enzimas extremofílicas es una adaptación de la flexibilidad y estabilidad estructural que les permite resistir y ser activas en condiciones ambientales drásticas. Estas adaptaciones son pequeños cambios en las interacciones intramoleculares o con el solvente que son causadas por modificaciones en la estructura primaria de las enzimas. Aunque también se contemplan otro tipo de cambios como las modificaciones postraduccionales de aminoácidos que afectan su forma de relacionarse con su entorno (Castilla et al., 2021).

## 2.2. Objetivos del capítulo

### 2.2.1. Objetivo general

Purificar y caracterizar la enzima Lip J2 obtenida como cuerpos de inclusión a partir del sistema de expresión desarrollado en *E. coli*.

### 2.2.2. Objetivos específicos

- Desarrollar un protocolo de purificación de Lip J2 a partir de los cuerpos de inclusión obtenidos del cultivo de la cepa AC IV.
- Realizar la caracterización bioquímica de Lip J2

## 2.3. Materiales y métodos

### 2.3.1. Obtención de los cuerpos de inclusión

Se llevó a cabo el cultivo y posterior lisis celular del transformante AC IV según las condiciones descritas en 1.3.3.1, se resuspendió la fracción insoluble correspondiente a 50 mL de cultivo, en 3 mL de buffer Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 M, EDTA 10 mM tritón X-100 2%, pH 8,0, y se incubó durante 30 minutos en hielo. Se centrifugó a 4 °C y 15000 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se conservó el pellet donde se encuentran los cuerpos de inclusión. El pellet se resuspendió en 5 mL de buffer Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 M. EDTA 10 mM tritón X-100 2%, pH 8,0 y se centrifugó a 4 °C y 15000 rpm durante 15 min, este proceso de lavado se repitió 3 veces, descartando el sobrenadante cada vez, la fracción obtenida se denominó cuerpos de inclusión lavados.

### 2.3.2. Ensayos de solubilización de los cuerpos de inclusión

Los cuerpos de inclusión lavados, correspondientes a 100 mL de cultivo fueron sometidos a diferentes procesos de solubilización como se detalla a continuación:

- a) fueron resuspendidos en 10 mL de buffer Tris-HCl 50 mM, urea 8 M, ditioneitol (DTT) 5 mM, pH 8,0, incubados 18 horas a 4 °C, con agitación constante en rotatorque.
- b) fueron resuspendidos en 10 mL de buffer Tris-HCl 50 mM, SDS 10%, DTT 5 mM, pH 8,0, incubados 18 horas a 4 °C, con agitación constante en rotatorque.

- c) fueron resuspendidos en 10 mL de buffer Tris-HCl 50 mM, guanidina 6M, DTT 5 mM, pH 8,0, incubados 18 horas a 4 °C, con agitación constante en rotatorque.

Luego de la incubación cada ensayo fue centrifugado a 4 °C y 8000 rpm durante 10 minutos, y se separó el sobrenadante del pellet, el cual fue resuspendido en 2 mL de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Ambas fracciones fueron conservadas para su análisis mediante PAGE-SDS.

### 2.3.3. Protocolo de renaturalización de Lip J2 a partir de cuerpos de inclusión

Los cuerpos de inclusión lavados correspondientes a 50 mL de cultivo, se resuspendieron en 4 mL de buffer Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, guanidina 6 M, pH 8,0, y se homogeneizaron hasta tener una solución de proteína desnaturalizada. Se suplementó con DTT concentración final 100 mM, y se incubó a 4 °C durante 16 horas; posteriormente se centrifugó a 4 °C y 10000 rpm durante 30 minutos. Se descartó el pellet, el SN se acidificó hasta pH 4,0 y se dializó 2 veces contra 1 L de Tris 100 mM, guanidina 6 M, EDTA 5 mM, pH 4,0, durante 2 horas cada vez. El dializado se dispersó a ritmo 1 gota por minuto, con agitación magnética constante, en 1 L de buffer Tris-HCl 100 mM, EDTA 5 mM, glutatión oxidado 1 mM, glutatión reducido 5 mM, arginina 300 mM, pH 9,6, a 4 °C. Una vez finalizado el goteo se mantuvo la agitación durante 18 horas. Posteriormente se filtró mediante filtro de corte 0,45 µm (Minisart® Syringe Filter). Se concentró la solución mediante filtración por flujo tangencial utilizando cassette Pellicon XL Biomax (Millipore) con membrana de corte de 10 kDa, se recirculó la solución a un flujo de 5 mL/min hasta que se concentró 50 veces, el proceso se realizó a 4 °C. El concentrado se dializó tres veces (2 horas cada vez) contra 1 L de buffer fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,6, a 4 °C.

### 2.3.4. Protocolo de purificación de Lip J2 a partir de cuerpos de inclusión

La proteína de interés presente en el concentrado dializado fue purificada mediante cromatografía de afinidad mediante iones metálicos inmovilizados (IMAC). El proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente, en un ÄKTA Purifier dotado de una columna HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare), la muestra se aplicó a un flujo de 0,5 mL/min; se lavó la columna con 10 mL de buffer fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,6, flujo

de 0,5 mL/min, para remover la proteína no unida. Finalmente, la proteína de interés se eluyó con buffer fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,6 suplementado con imidazol mediante aplicación de un gradiente de imidazol de 0 a 300 mM, flujo de 0,5 mL/min. El eluido se dializó en 4 etapas de 2 horas cada una, contra 1 L de buffer Tris-HCl 20 mM, con concentración de imidazol decreciente (150, 75, 25 mM y sin imidazol respectivamente), pH 8,0, con agitación magnética constante y a 4 °C. El eluido dializado se almacenó a -20 °C para su posterior caracterización.

### 2.3.5. Definición de unidad de enzima

Cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de MUF por minuto a pH 8,0 y 50 °C.

### 2.3.6. Ensayo de actividad frente a derivados de MUF

Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en placa de ELISA a 50 °C, se realizaron triplicados de cada medida; la mezcla reactiva se compuso de 50  $\mu$ L de MUF-butirato 0,8 mM, Tritón X-100 0,8 %, NaCl 2 mM, KCl 2 mM y 50  $\mu$ L de una dilución de la enzima a ensayar en buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,0. Se midió la liberación de MUF durante 30 minutos y se cuantificó mediante fluorescencia en un espectrofluorímetro Synergy HTX Biotek ( $\lambda_{ex}$ =320 nm,  $\lambda_{em}$ =448 nm). Las soluciones se termostataron a 50 °C previo a la medida. Las concentraciones de MUF se determinaron por interpolación de las lecturas obtenidas con una curva de calibración previamente construida. Alternativamente para la determinación de la especificidad de sustrato se utilizaron como sustrato MUF-heptanoato y MUF-oleato. Para cada medida se realizaron además sus respectivos blancos: mezcla de reacción sin enzima, mezcla de reacción sin sustrato y mezcla de reacción sin ambos componentes.

### 2.3.7. Estudio del efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática

Se estudió el efecto de diferentes metales sobre la actividad enzimática, para ello se llevó a cabo el ensayo de actividad descrito anteriormente suplementando la alícuota de sustrato con una solución stock de una sal del metal (NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CoSO<sub>4</sub>, NiSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>) a evaluar de forma que la concentración de este en la mezcla de reacción fuera 1, 2 o 10 mM.

### 2.3.8. Estudio del efecto del pH sobre la actividad enzimática

Se evaluó la actividad enzimática siguiendo el procedimiento descrito en 2.3.6, sustituyendo el buffer allí indicado por buffer ATB (ácido acético 50 mM, Tris-HCl 50 mM, ácido bórico 50 mM) al pH indicado en cada caso.

### 2.3.9. Estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

Se evaluó la actividad enzimática siguiendo el procedimiento descrito en 2.3.6, variando la temperatura en un rango de temperaturas entre 30 y 50 °C. Para temperaturas superiores a 50 °C se incubó la mezcla de reacción durante 15 minutos a la temperatura indicada, pasado ese tiempo se detuvo la reacción mediante enfriamiento en baño de hielo durante 5 minutos, y se midió el MUF liberado según lo descrito anteriormente.

### 2.3.10. Estudio de la estabilidad frente al pH

La estabilidad frente al pH se llevó a cabo incubando la enzima en buffer ATB al pH a evaluar durante 24 horas a 4 °C. Luego de la incubación se midió la actividad remanente en las condiciones descritas en 2.3.6.

### 2.3.11. Estudio de la estabilidad frente a la temperatura

La estabilidad frente a la temperatura se llevó a cabo incubando a diferentes temperaturas la enzima en buffer Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 mM, KCl 1 mM, pH 8,0, durante 1 hora. Luego de la incubación se midió la actividad remanente en las condiciones descritas en 2.3.6.

### 2.3.12. Estudio del efecto de agentes desnaturalizantes, detergentes e inhibidores sobre la actividad enzimática

Se determinó la actividad enzimática en las condiciones descritas en 2.3.6 incluyendo en la mezcla de reacción, según correspondiera, diferentes concentraciones de SDS (0 a 2% p/v), tritón X-100 (0 a 2% v/v), urea (0 a 5 M) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (0 a 3 mM).

### 2.3.13. Determinación de parámetros cinéticos $K_m$ y $k_{cat}$

Los parámetros cinéticos fueron determinados realizando el ensayo de actividad descrito en 2.3.6 variando la concentración de MUF butirato entre 25 y 400  $\mu\text{M}$ . La determinación de los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $k_{cat}$  se llevó a cabo mediante la linealización de la ecuación de Michaelis-Menten propuesta por Lineweaver-Burk.

### 2.3.14. Estudio de la actividad enzimática en presencia de solventes

Se determinó la actividad enzimática siguiendo el procedimiento descrito 2.3.6, modificando la temperatura de la reacción a 40 °C e incluyendo en la mezcla de reacción diferentes concentraciones de etanol o metanol (5 a 20% v/v) o glicerol (0 a 20% v/v).

### 2.3.15. Estudio de la estabilidad en presencia de solventes

Se incubó la enzima a 40 °C durante 48 horas en presencia de etanol 10% v/v y se midió la actividad enzimática remanente siguiendo el procedimiento descrito en 2.3.6 modificando la temperatura de reacción a 40 °C.

## 2.4. Resultados y discusión

### 2.4.1. Ensayos de solubilización de los cuerpos de inclusión

El primer paso para la purificación de la enzima de interés a partir de los cuerpos de inclusión fue lograr su solubilización. Cabe aclarar que este proceso no es selectivo para Lip J2, todas las proteínas presentes en los cuerpos de inclusión podrían ser solubilizadas mediante este proceso. Para lograr la solubilización se utilizaron los protocolos descritos en 2.3.2, como allí se puede apreciar los tratamientos incluyeron un agente desnaturizante SDS, urea o guanidina, cuyo objetivo es la ruptura de interacciones no covalentes, y DTT para la reducción de los posibles puentes disulfuro que pueden formarse entre los residuos de cisteínas inter- o intracatenarios. Luego de la incubación en las condiciones indicadas se centrifugó la muestra y se separó el sobrenadante del *pellet*, el cual fue resuspendido y utilizado para evaluar la cantidad de proteína no solubilizada. La elevada concentración de urea o guanidina presente en la fracción solubilizada impide que estas puedan ser evaluadas directamente mediante la técnica seleccionada ya que afectan negativamente el desarrollo de la electroforesis. Sin

embargo, es posible visualizar los resultados mediante el estudio de la fracción que no logró ser solubilizada mediante estos protocolos, por lo que la ausencia de proteína en

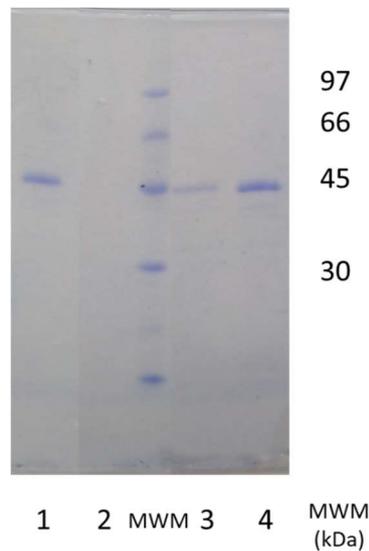


Figura 2.1. Evaluación del proceso de solubilización de los cuerpos de inclusión realizado mediante PAGE-SDS en gel homogéneo 12,5% revelado con coomassie. Carril 1 cuerpos de inclusión sin tratar, carril 2 cuerpos de inclusión tratados con guanidina 6M, MWM marcador de peso molecular "Amersham low molecular weight marker calibration, carril 3 cuerpos de inclusión tratados con urea 8 M, carril 4 cuerpos de inclusión tratados con SDS 10%.

esta fracción indicaría que el tratamiento de solubilización fue efectivo. En la *Figura 2.1*, se muestra el análisis mediante PAGE SDS de los tres tratamientos llevados a cabo evidenciándose que solamente el realizado con guanidina fue efectivo. La aplicación de guanidina 6 M logró la completa solubilización de los cuerpos de inclusión, mientras que los tratamientos con urea 8 M y SDS 10% sólo lograron solubilizar en forma parcial las proteínas presentes en la muestra de partida, siendo el tratamiento con urea mejor que el llevado a cabo con SDS en las condiciones señaladas. Estos resultados están en consonancia con lo señalado por Burgess *et al*, quien indica el mismo orden de efectividad de los compuestos ensayados para la solubilización de enzimas. En base a estos resultados, se seleccionó el tratamiento con guanidina 6 M como el indicado para la concreción del objetivo planteado (Burgess, 2009).

La adición de agentes desnaturizantes con el fin de lograr la solubilización de los cuerpos de inclusión causa la desnaturalización total de las estructuras proteicas presentes, y por ende la pérdida de actividad de la enzima de interés. Consecuentemente, la remoción total de estos compuestos es crucial para favorecer el

correcto plegamiento de LipJ2 en su forma activa. Para ello se exploraron diferentes estrategias, en primer término, se removió la guanidina mediante cromatografía de exclusión molecular en columna PD-10, no recuperándose actividad lipasa en el eluido ni visualizándose por electroforesis la presencia de proteína en el mismo. Esto sumado a que la columna presentaba un cambio de aspecto a la vista, nos llevó a pensar que la remoción del agente desnaturante de forma brusca provocó la precipitación de la proteína dentro de la columna. Si bien la renaturalización en columna es un procedimiento que se aplica, pocos casos han mostrado ser exitosos, según datos reportados por la plataforma de replegamiento de proteínas de la Universidad de Monash, Australia y el National Institute of Genetics de Japón, de las 1877 proteínas que se han reportado y depositado en su base de datos, solamente 257 (14 %) ha sido posible realizarlo mediante una estrategia de afinidad en columna (Chow et al., 2006; Mizutani et al., 2017). Alternativamente se realizó la remoción mediante diálisis en etapas, disminuyendo la concentración de guanidina en forma gradual, descendiendo la concentración de guanidina de 6 M a 0, a una tasa de -0,5 M cada 1,5 horas. Durante este proceso también se constató la precipitación de proteína dentro de la membrana de diálisis cuando la concentración de guanidina en el buffer de diálisis era menor a 2 M. Al finalizar el proceso se centrifugó el dializado y se evaluó la actividad lipasa en el sobrenadante, no constatándose la misma. El comportamiento observado puede estar relacionado con la elevada concentración de proteína en la solución de partida, dado que el volumen de muestra se mantiene constante durante todo el proceso, una vez que se retira el agente desnaturante. En esas condiciones compiten los procesos de replegamiento con las interacciones proteína-proteína, mientras que las primeras son lentas, las segundas tienen un orden de reacción mayor, lo que puede causar nuevamente la precipitación. Si bien la guanidina 6M fue efectiva como agente solubilizante de los cuerpos de inclusión, mediante las estrategias descritas hasta el momento no fue posible replegar la proteína a estructuras que presentaran actividad enzimática.

En este punto se recurrió al asesoramiento de la Plataforma de Proteínas Recombinantes del Instituto Pasteur de Montevideo, quienes nos facilitaron el protocolo de renaturalización por goteo descrito en 2.3.3. En este protocolo se parte de los cuerpos de inclusión lavados, los cuales fueron solubilizados mediante el agregado

de guanidina 6 M, completándose la desnaturalización por la acidificación de la muestra y la adición de DTT a una concentración final de 100 mM. La solución conteniendo a Lip J2 desnaturalizada fue goteada muy lentamente (1 mL/hora) sobre una solución concentrada de arginina y el par glutatión reducido-glutatión oxidado, en buffer a pH neutro, de forma que la concentración de proteína sea muy baja y no sea un factor que favorezca la agregación. El objetivo de esta estrategia es que el volumen de solución sobre la que se realiza el goteo sea suficientemente grande (250 veces mayor) para que la concentración del agente desnaturalizante una vez que se diluye la gota en la solución final sea tendiente a cero; esto realizado en presencia de concentración elevada de arginina evitaría interacciones inespecíficas entre cadenas de proteína lo que favorecería el correcto plegamiento de las mismas, mientras que la presencia de glutatión impediría la formación inadecuada de puentes disulfuro (Baynes et al., 2005; S. M. Singh & Panda, 2005). Posteriormente, la solución que contiene a Lip J2 fue filtrada con filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  y concentrada mediante filtración tangencial utilizando un casete comercial de corte 10 kDa. Este paso tiene doble propósito, por un lado, disminuir el volumen de la solución de cara a la purificación por IMAC, y por otra parte remover la arginina presente. La disminución del volumen de solución a purificar es necesaria para acortar el tiempo requerido para el paso de IMAC ya que este se realizó a temperatura ambiente y el tiempo de exposición a dicha temperatura podría haber sido crucial. Por otra parte, la remoción de arginina es necesaria ya que ésta interfiere en la cromatografía de afinidad con metales inmovilizados. La arginina presenta mayor afinidad por el níquel unido a la matriz que la cola de histidina presente en la proteína de interés, además es capaz de remover el níquel que no está unido covalentemente, en ambos casos el efecto es el mismo, se disminuye la capacidad de la columna (Abe et al., 2009). Por otra parte, como se muestra en el capítulo 5, es capaz de catalizar la hidrólisis del MUF-butirato utilizado como sustrato de los ensayos de actividad. La filtración tangencial no fue suficiente para remover la totalidad de la arginina, por lo que se incluyeron tres pasos de diálisis posteriores, luego de los cuales se consideró efectiva la remoción cuantitativa de la arginina ya que no se constataron los efectos antes mencionados.

A partir del concentrado dializado se llevó a cabo la purificación de Lip J2 mediante IMAC utilizando una matriz de  $\text{Ni}^+$  inmovilizado en un soporte de Sepharose de alta

performance. Este proceso se llevó a cabo en un ÄKTA Purifier dotado de una columna HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare), lo que nos permitió monitorear en tiempo real el proceso mediante la medida de absorbancia a 280 nm. La proteína adsorbida a la columna eluyó en un único pico a una concentración de imidazol de 270 mM. El proceso

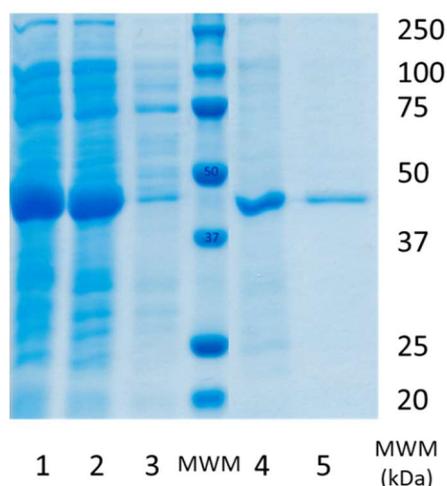


Figura 2.2. Evaluación del proceso de purificación de Lip J2 mediante IMAC, realizado mediante PAGE-SDS en gel homogéneo 12,5% revelado con Coomassie coloidal. Carril 1 cuerpos de inclusión lavados, carril 2 muestra aplicada a la cromatografía, carril 3 percolado, carril 4 eluido, carril 5 volumen muerto de la cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex 75 10/300, MWM marcador de peso molecular Precision Plus Protein (BIORAD)

de purificación se evaluó mediante PAGE-SDS cuyo resultado se muestra en la *Figura 2.2*, como allí se puede apreciar en los carriles 1,2, 4 y 5 hay una banda mayoritaria de peso aproximado 44 kDa la cual corresponde a Lip J2. También se aprecia que los cuerpos de inclusión lavados y la muestra tratada con el protocolo de renaturalización (ver 2.3.3) tienen un perfil de proteínas similar, lo que indica que la solubilización realizada afectó por igual manera a todas las proteínas presentes en la muestra. En el carril 3 correspondiente al percolado del IMAC se puede ver que gran parte de la proteína presente en la banda correspondiente a Lip J2 se adsorbió a la columna, pero no su totalidad, lo que puede deberse a que se sobrepasó la capacidad de unión a la matriz cromatográfica o a que existe otra proteína de igual peso molecular la cual no se adsorbe a la matriz. Esto último es lo más probable ya que la capacidad dinámica de unión del soporte Ni-Sepharose high performance (His Trap HP) declarada por el fabricante es de al menos 40 mg de proteína-(histidina)<sub>6</sub>/ml de medio, que para nuestro caso serían al menos 200 mg de proteína (Sepharose et al., n.d.) y se ofrecieron 48 mg

de proteína medida mediante absorbancia a 280 nm. Por su parte el eluido contuvo en total

Tabla 2.1. Evaluación del proceso de solubilización de los CI lavados y purificación de Lip J2.

Fracción	Volumen (mL)	Concentración (mg/mL)	Proteínas totales (mg)	Rendimiento (%)
CI desnaturalizados	4,0	12,70	50,8	-
CI diluidos	400,0	0,09	36,0	71
Aplicado IMAC (concentrado dializado)	42,0	0,27	11,3	22
Eluido IMAC	3,0	3,2	9,6	19

9,6 mg de proteína, lo cual está muy lejos de saturar la capacidad dinámica de la columna y además corresponde aproximadamente al 20% del total de proteínas presentes en los cuerpos de inclusión lavados, medido mediante absorbancia a 280nm, como se puede apreciar en la Tabla 2.1. No fue posible monitorear el proceso de purificación a través de la medida de actividad ya que los cuerpos de inclusión no presentaron actividad lipasa, solamente fue posible monitorear la actividad lipasa a partir de la fracción eluida del IMAC la cual fue de 1,2 UE/mL, por lo que la actividad específica fue de 0,063 UE/mg de proteína purificada. En resumen, se puede concluir que aproximadamente se purificaron 6 mg de Lip J2 por cada litro de cultivo, este valor se encuentra por debajo de lo reportado para proteínas expresadas en forma soluble en este sistema de expresión en las mismas condiciones donde se alcanzan niveles de hasta 500 mg/L de cultivo.

Finalmente, a la fracción eluida del IMAC se le realizó una cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex 75 10/300 (rango de fraccionamiento para proteínas globulares 3-70 kDa) para determinar el peso molecular de Lip J2. En la *Figura 2.3* se muestra el cromatograma de elución, las flechas indican el volumen de elución de las proteínas utilizadas para calibrar la columna (conalbumina de 75 kDa, ovoalbúmina de 43 kDa y ribonucleasa A de 13,7 kDa). Se puede apreciar un pico mayoritario que eluye en un volumen mayor al volumen de elución de la conalbumina (75kDa) que presumiblemente corresponde al volumen muerto de la columna utilizada y corresponde a Lip J2 (ver carril 5 de la *Figura 2.2*). El hecho que LipJ2 eluya en el volumen muerto donde eluyen las proteínas con PM mayores a 70kDa, indicaría la formación de

agregados de la proteína monomérica de 45 KDa, lo cual no es extraño dada la naturaleza hidrofóbica de esta familia de proteínas (Castilla et al., 2021); y también sustenta lo observado en la etapa de producción donde la proteína se expresó formando cuerpos de inclusión.

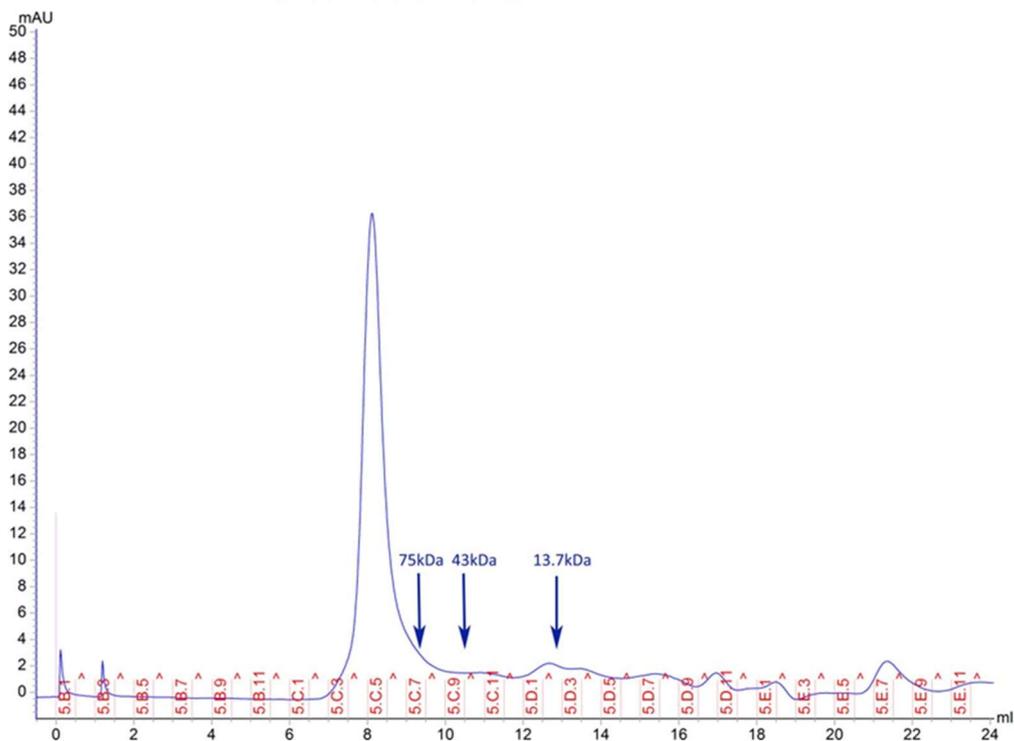


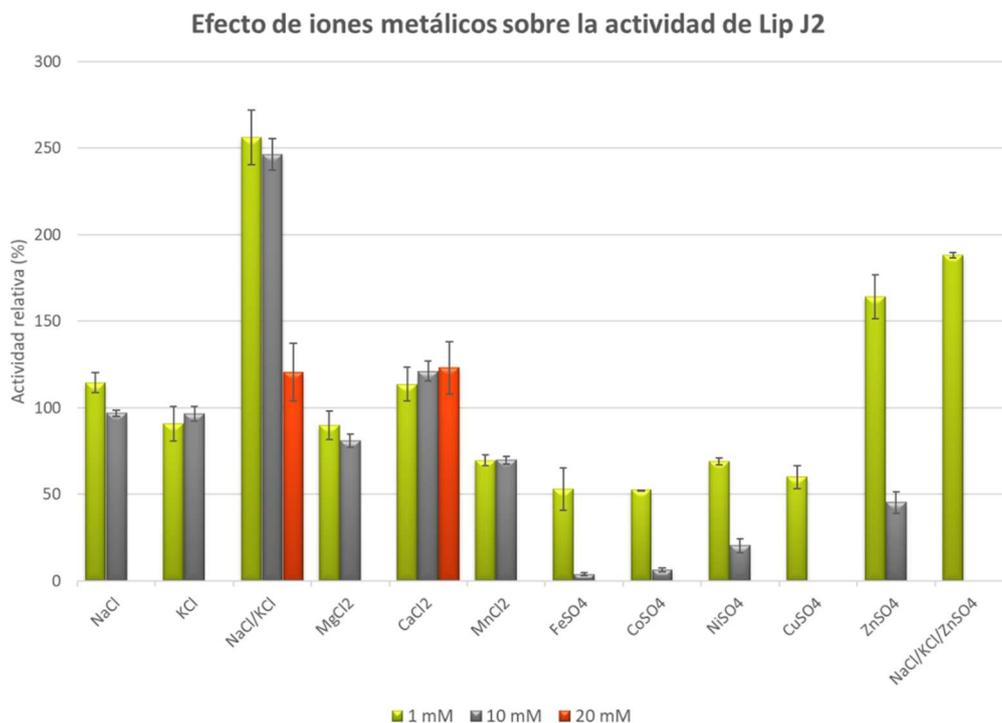
Figura 2.3. Cromatograma de elución de la cromatografía de exclusión molecular realizada a Lip J2 purificada por IMAC. Columna Superdex 75 10/300, elución realizada en buffer fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,6.

#### 2.4.2. Determinación de la especificidad de sustrato

La determinación de la especificidad de sustrato llevada a cabo mediante el procedimiento descrito en 2.3.6, variando el derivado de MUF utilizado dejó en evidencia que Lip J2 tiene elevada preferencia por sustratos de cadena corta (MUF-butirato) y su actividad disminuye conforme al aumento del largo de cadena del sustrato que se ensaya. La actividad frente a MUF-heptanoato y MUF-oleato se redujo en un 70% y 98% respectivamente respecto a la apreciada cuando se utilizó MUF-butirato como sustrato. Este comportamiento posiciona a Lip J2 como una esterasa.

### 2.4.3. Estudio del efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática

Se llevó a cabo el estudio del efecto de diez iones metálicos diferentes sobre la actividad enzimática para lo cual se suplementó la mezcla de reacción con tres concentraciones diferentes de cada metal (1, 10 y 20 mM). Los resultados se muestran en la *Figura 2.4*. Como se puede apreciar, de todos los metales estudiados solamente la presencia de zinc 1 mM ( $Zn^{2+}$ ) fue capaz de generar un aumento significativo en la actividad en un factor de 1,5 veces, mientras que la adición de sodio ( $Na^+$ ) en baja concentración o calcio ( $Ca^{2+}$ ) producen una leve mejoría en la misma. La utilización de  $Zn^{2+}$  con fin de aumentar la actividad enzimática debe ser cautelosa, ya que, a concentraciones de 10 mM o superiores, el metal se convierte en inhibidor. Un resultado sorprendente fue el efecto causado por la presencia conjunta de  $Na^+$  y  $K^+$ , tanto en concentración final de 1 como



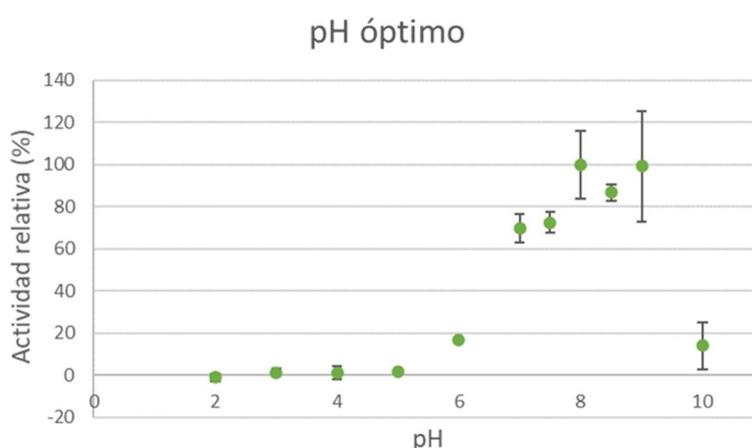
*Figura 2.4. Efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática de Lip J2. Se consideró la mezcla de reacción sin agregado de metal como 100% de actividad, las concentraciones indicadas son finales en la mezcla de reacción.*

de 10 mM para cada metal, donde producen un efecto sinérgico aumentando la actividad enzimática, a más del doble, cuando afectaron la actividad. También se observó un aumento, casi al doble, de la actividad enzimática al agregar conjuntamente  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Zn^{2+}$  a concentración final de 1mM para cada metal. Por otra parte, la adición

de  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Cu^{2+}$  a cualquiera de las concentraciones ensayadas provocó un descenso en la actividad de Lip J2. Este comportamiento frente a  $Na^+$  y  $K^+$  es frecuente en lipasas de microorganismos halófilos y se debe a que la interacción de estos iones con residuos de ácido glutámico o aspártico contribuye a aumentar la cantidad de agua disponible alrededor de la enzima, lo que favorece a su actividad.(Castilla et al., 2021; Delgado-García et al., 2018). Lo cual es coherente con lo reportado para el género *Janibacter*, que si bien no ha sido descrito como halófilo, muchas de las especies que lo constituyen son capaces de crecer en concentraciones de NaCl superiores al 8 % p/v, *J. hoylei* particularmente es capaz de crecer a una concentración de NaCl de 11 % p/v (G. Zhang et al., 2014).

#### 2.4.4. Estudio del efecto del pH sobre la actividad enzimática

En la *Figura 2.5* se muestra el efecto del pH sobre la actividad enzimática, la cual fue evaluada en un rango de pH entre 2,0 y 10, 0. Como allí se puede apreciar, la enzima no presenta actividad a pH 5,0 o inferiores, mientras que a pH 6,0 expresa 20 % de la actividad máxima observada. En el rango de pH entre 7,0 y 7,5 la enzima expresa un 70 % de la actividad máxima, presentando su máximo en el rango de pH de 7,0 a 9,0, mientras que a valores de pH mayores la actividad decae abruptamente.



*Figura 2.5. Determinación del pH óptimo para Lip J2. La actividad relativa se calculó como la relación de los micromoles de MUF liberados por minuto a 50 °C, al pH indicado en cada caso, respecto a los liberados a pH 8,0.*

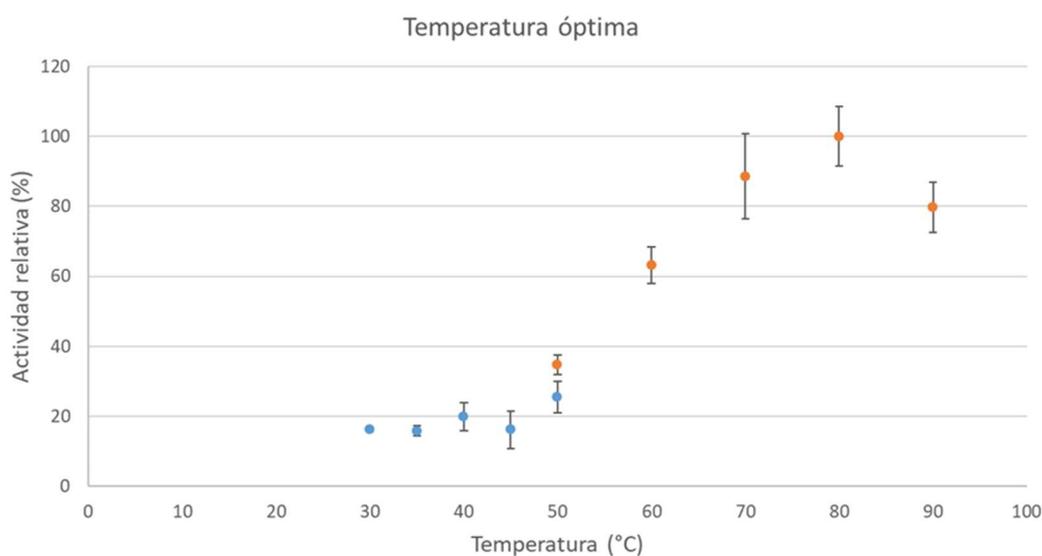
#### 2.4.5. Estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

Como se puede apreciar en la *Figura 2.6*, Lip J2 presenta su temperatura óptima en el rango de 70 a 90 °C, por debajo de este rango la actividad disminuye aproximadamente 20% cada 10 °C hasta los 50 °C. Por encima de los 90 °C no fue evaluada la actividad, debido a que la variación en la medida generaba un error muy grande. Frente a este resultado podemos asegurar que nos encontramos en presencia de una enzima hipertermófila, lo cual es llamativo ya que fue aislada a partir de un microorganismo mesófilo proveniente de suelo de la Antártida. Si bien el resultado es sorprendente, no se trata de un hecho aislado, ya que existen reportes previos de enzimas termofílas aisladas de microorganismos mesófilos, como es el caso de la lipasa LipS221 de *Streptomyces fradiae*, la cual presenta una temperatura óptima de 55 °C, mientras que el microorganismo del cual se aisló tiene una temperatura óptima de crecimiento de 26 °C; así como la lipasa estUT1 de *Ureibacillus thermosphaericus* presenta una temperatura óptima de 70 °C, mientras que el microorganismo crece a 37 °C, no siendo los únicos casos existentes (Rathi, Bradoo, Saxena, & Gupta, 2000; Subathra Devi, Mohanasrinivasan, Chetna, Nikhil, & Jemimah Naine, 2015; Sugihara, Ueshima, Shimada, Tsunasawa, & Tominaga, 1992; X. Wang, Yu, & Xu, 2009). Debido a limitaciones operativas no fue posible medir todo el rango de temperaturas aplicando el mismo procedimiento, ya que el espectrofluorímetro utilizado alcanza hasta 50 °C, a temperaturas superiores (marcadas en naranja) los ensayos de actividad se realizaron en bloque calefactor, luego de transcurrido el tiempo del ensayo, se detuvo la reacción

mediante la incubación en baño de hielo y se midió la cantidad de MUF liberado, en todos los casos se trabajó en velocidades iniciales.

#### 2.4.6. Estudio de la estabilidad frente al pH

Se observó que Lip J2 es estable en un amplio rango de pH conservando más del 70 % de su actividad luego de ser incubada en las condiciones descritas en 2.3.10 a pH entre 1,0 y 10,0 como se puede apreciar en la *Figura 2.7*. Lip J2 mostró buena estabilidad en condiciones de acidez extrema como pHs 1,0 y 2,0 reteniendo el 70% de la actividad inicial; la estabilidad aumentó gradualmente en el rango de pH de 3,0 a 7,0 (80 a 100%),



*Figura 2.6. Determinación de la temperatura óptima para Lip J2. La actividad relativa se calculó como la relación de los  $\mu$ moles de MUF liberados por minuto a pH 8,0, a la temperatura indicada en cada caso respecto a 80 °C.*

mientras que a los pH superiores evaluados la actividad se mantuvo inalterada luego de ser incubada en las condiciones señaladas.

Al relacionar esta característica con el rango de pH donde la enzima presenta mayor actividad podemos decir que Lip J2 posee un comportamiento tal que podría ser empleada en procesos llevados a cabo a pH entre 7,0 y 9,0 sin temor a que se produzca una disminución en su eficiencia en las condiciones señaladas.

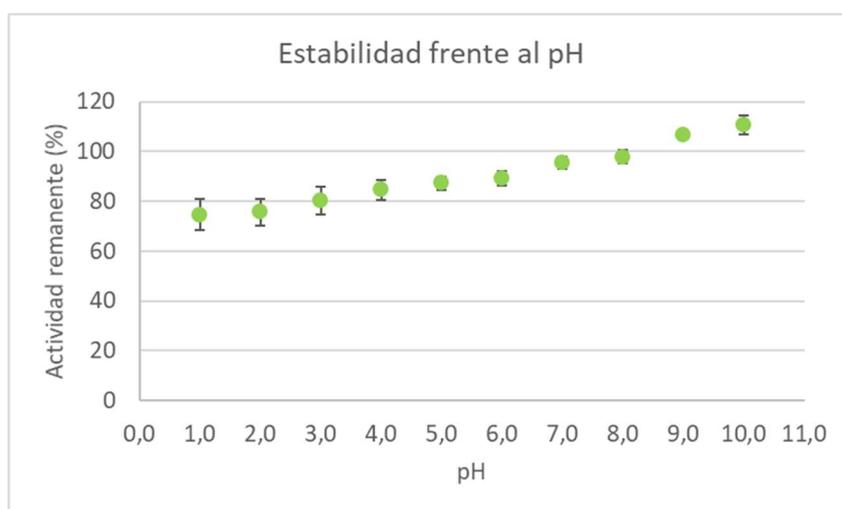


Figura 2.7. Estabilidad frente al pH. Se muestra la actividad remanente luego de incubar la enzima 24 horas a 4 °C al pH indicado en cada caso, comparada con la actividad sin incubar.

#### 2.4.7. Estudio de la estabilidad frente a la temperatura

Al realizar los ensayos de evaluación de la estabilidad frente a la temperatura se constató que la enzima presenta gran estabilidad frente a este parámetro en todo el rango estudiado (10 a 99 °C) conservando aproximadamente el 100 % de la actividad luego de la incubación en las condiciones descritas en 2.3.11 (1 hora a pH 8,0 a las diferentes temperaturas) (ver Figura 2.8). Este dato resulta muy importante ya que, al tratarse de una enzima hipertermófila, que presentó un rango de temperatura óptima entre 70-90 °C, el hecho que sea estable a temperaturas elevadas la convierte en una herramienta interesante para su aplicación a procesos llevados a cabo en esas condiciones.

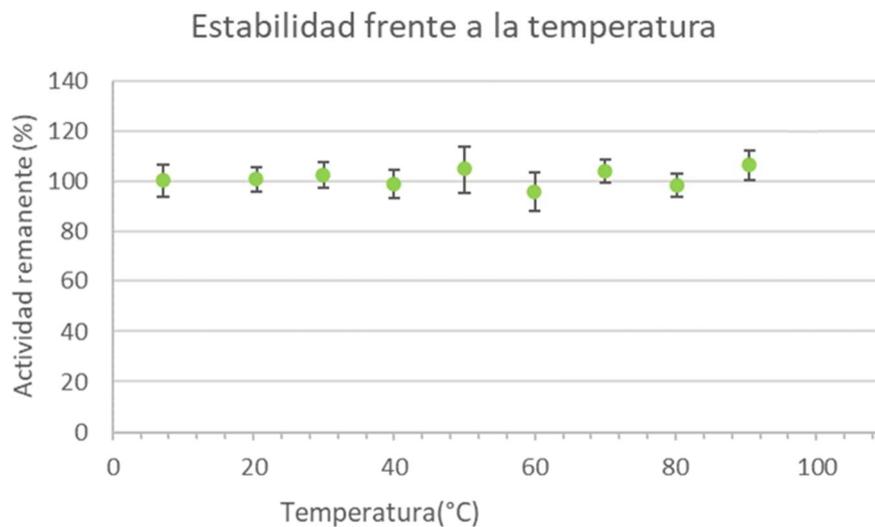


Figura 2.8. Estabilidad frente a la temperatura. Se muestra la actividad remanente luego de incubar la enzima 1 hora a la temperatura indicada en cada caso, comparada con la actividad sin incubar.

#### 2.4.8. Estudio del efecto de agentes desnaturalizantes sobre la actividad enzimática

Los diferentes agentes desnaturalizantes con los que se suplementó la mezcla reactiva tuvieron efectos dispares sobre la actividad de Lip J2. La presencia de urea en concentraciones entre 0,5 y 2 M tuvo un efecto activador aumentando la actividad hasta en un 20% respecto a la actividad en ausencia de urea, mientras que entre 3 y 4 M de urea no se observó ningún efecto sobre la actividad enzimática, actuando en detrimento de ésta a concentraciones superiores a 5 M.

Por otra parte, la presencia del inhibidor de serina hidrolasas PMSF en la mezcla de reacción no tuvo ningún tipo de efecto sobre la actividad de Lip J2 lo que podría indicar que la enzima no cuenta con una serina como aminoácido nucleofílico de la triada catalítica, este hecho se discutirá más adelante en el punto 2.4.10.

La presencia de detergentes si tuvo un efecto negativo sobre la actividad enzimática, la cual se vio reducida en un 50 % por la presencia de 0,5 % p/v de SDS en la mezcla de reacción, mientras que la aplicación de Tritón X-100 0,5 % v/v provocó la pérdida del 40 % de la actividad, la cual aumentó al 80 % cuando la concentración de Tritón X-100 fue 2 % v/v en la mezcla de reacción. Como se ha visto en otros casos la presencia de

surfactantes como el Tritón X-100 tienen un efecto positivo sobre la actividad las lipasas evitando su agregación y favoreciendo la interacción enzima sustrato, mientras que a concentraciones elevadas puede afectar estructuralmente a la enzima y con ello su actividad catalítica (Sukohidayat, Zarei, Baharin, & Manap, 2018).

#### 2.4.9. Determinación de los parámetros cinéticos

Se determinaron los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $k_{cat}$  mediante la linealización de la ecuación de Michaelis-Menten propuesta por Lineweaver-Burk, a partir de la cual se obtuvieron los siguientes valores utilizando MUF butirato como sustrato:  $K_m = 873 \pm 120 \mu M$  y  $k_{cat} = 21 \pm 4 \text{ min}^{-1}$ , cuando la reacción se llevó a cabo a  $50 \text{ }^\circ C$  y  $pH 8,0$ , no observándose activación interfacial, como era esperado al tratarse de una esterasa.

#### 2.4.10. Estudio de la actividad enzimática en presencia de solventes

Con el fin de determinar si Lip J2 es candidata para catalizar la síntesis de biodiesel se llevaron a cabo diferentes estudios de actividad y estabilidad en las condiciones

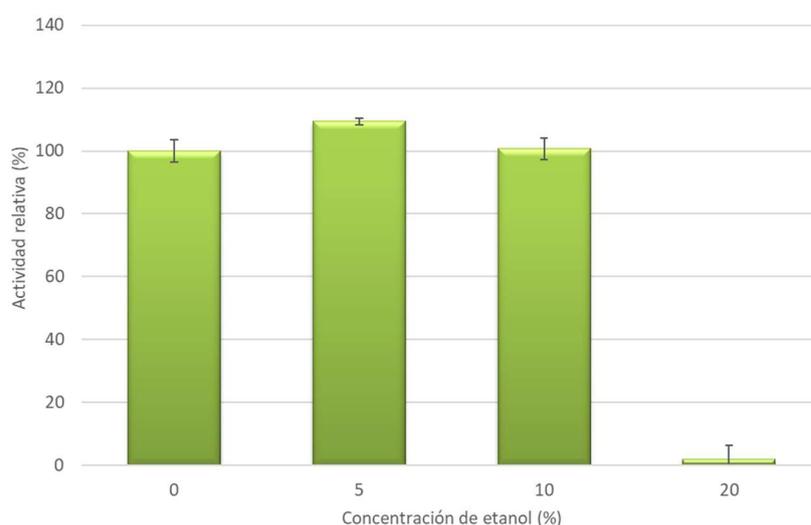
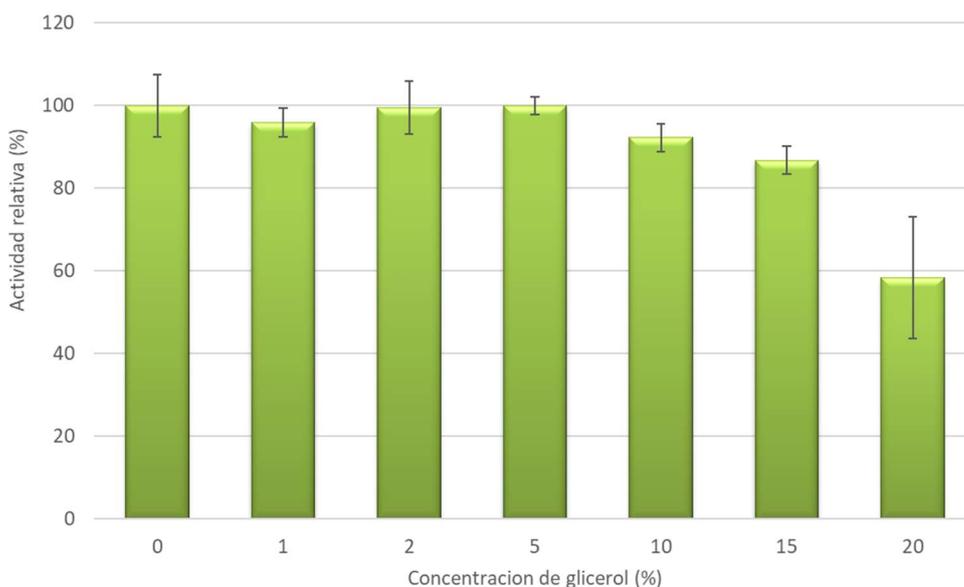


Figura 2.9. Efecto del etanol en la actividad enzimática de Lip J2. Se compara la actividad respecto a la observada en ausencia del alcohol. La actividad fue medida a  $40 \text{ }^\circ C$  y  $pH 8,0$ .

utilizadas a nivel industrial para tal fin. Estas incluyen la presencia de metanol a una concentración de 10% v/v en la mezcla de reacción, el cual puede ser sustituido por

etanol en caso de catálisis enzimática. También es importante evaluar la actividad en presencia de glicerol ya que éste se produce en gran cantidad como resultante del proceso de síntesis y puede inhibir la actividad enzimática. Los ensayos se llevaron a cabo a 40 °C, ya que frecuentemente se eleva la temperatura de reacción con el fin de hacer más fluida la mezcla de reacción. En la *Figura 2.9* se puede apreciar que la enzima no sufre pérdida de su actividad hasta concentraciones de etanol de 10 % v/v, pero a 20 % v/v pierde totalmente la actividad. Este hecho es relevante ya que a nivel industrial se suele modular la concentración del alcohol en la mezcla de reacción con el objetivo de favorecer la síntesis de biodiesel. De igual forma se evaluó la actividad en presencia de 10% v/v de metanol en la mezcla de reacción donde se apreció que la enzima retiene 90 % de su actividad.

Cuando este ensayo se llevó a cabo en presencia de glicerol se obtuvieron los resultados que se aprecian en la *Figura 2.10*, la presencia de glicerol a concentraciones de hasta 5 % v/v no tuvo efecto sobre la actividad de Lip J2, a concentraciones entre 10 y 15 % v/v la enzima retiene más del 80% de la actividad, mientras que cuando la concentración de glicerol fue de 20% la pérdida de actividad fue del 40%.



*Figura 2.10. Efecto del glicerol sobre la actividad enzimática de Lip J2. Se compara la actividad respecto a la observada en ausencia de glicerol. La actividad fue medida a 40 °C y pH 8,0.*

Complementariamente se llevó a cabo el estudio de la estabilidad de Lip J2 a 40 °C y en presencia de etanol 10% v/v, constatándose una actividad remanente del 95% a las 24 horas y del 84% a las 48 horas, mientras que el control de incubación sin solvente mostró una actividad remanente de aproximadamente 100% durante todo el ensayo.

Frente a estos resultados es posible afirmar que Lip J2 mantiene inalterada su actividad en las condiciones utilizadas industrialmente para la síntesis de biodiesel, especialmente a partir de etanol. Además, cuenta con la estabilidad necesaria para ser aplicada a procesos de por lo menos 48 horas en las condiciones de interés.

#### 2.4.11. Caracterización estructural de Lip J2

Complementariamente a la caracterización bioquímica, se llevó a cabo la caracterización estructural de Lip J2. Este trabajo fue realizado por la Dra. Pilar Díaz en la Universidad de Barcelona. El primer paso fue el análisis de la secuencia de Lip J2 y la búsqueda de homología con otras lipasas depositadas en bases de datos. Éste arrojó como resultado que Lip J2 no presentaba homología total con ninguna enzima reportada hasta el momento, siendo la estructura cristalizada de la lipasa de *Candida antarctica* CalA (Protein Data Bank accession number 2VEO) la más cercana, por lo que se decidió utilizarla como base para el modelado tridimensional de Lip J2. El análisis de la secuencia confirmó la presencia de un péptido señal, el cual indica el destino extracelular de la enzima en cuestión en el microorganismo de origen. Adicionalmente se confirmó la presencia del pentapéptido GX SXG (GYSQG) característico de lipasas, el cual incluye la serina catalítica, pese a que no se observó inactivación mediante la aplicación de PMSF. Este comportamiento puede deberse a factores estructurales que impiden el acceso del PMSF al sitio activo, si bien es inesperado para enzimas con una serina catalítica, ya ha sido descrito para otras enzimas relacionadas como: diacilglicerol lipasa de *Penicillium sp.*, lipasas de *Streptomyces coelicolor*, lipasa de *Acinetobacter calcoaceticus* LP009, esterasa de *Rhodococcus erythropolis* y palmitoil-preoteín tioesterasa-1 humana (Bisogno et al., 2003; Côté & Shareck, 2008; A. K. Das et al., 2000; Dharmstithi, Pratuangdejkul, Theeragool, & Luchai, 1998; Falcocchio, Ruiz, Pastor, Saso, & Diaz, 2005). También queda en evidencia la presencia de una elevada proporción de aminoácidos hidrofóbicos (49%) los cuales posteriormente se vio que se ubican

mayormente en la región próxima al sitio activo, lo que favorece la interacción con sustratos hidrofóbicos. Este hallazgo está en consonancia con lo reportado en la literatura como características comunes a las enzimas termofílicas e hipertermofílicas, que se describen como mayor hidrofobicidad del núcleo, mayor densidad de empaquetamiento, mayor número de interacciones iónicas, mayor cantidad de enlaces de hidrógeno, aumento en la formación de enlaces disulfuro, disminución de longitudes de la bucles que conectan estructuras secundarias, un aumento en las interacciones aromáticas catiónico- $\pi$ , estabilización por chaperones termoestables y un acortamiento general de la longitud (Atomi & Imanaka, 2004; X. X. Zhou et al., 2008). Muchas de estas características están respaldadas por cambios observados en la composición de aminoácidos, aumento de aminoácidos no polares que participan en interacciones hidrofóbicas junto con la disminución de residuos polares no cargados. Un aumento de residuos cargados puede favorecer la formación de un gran número de pares de iones estabilizadores; un aumento en la hidrofobicidad del residuo, que se espera que estabilice las proteínas adaptadas al calor a medida que el efecto hidrofóbico se vuelve más fuerte al aumentar la temperatura. Mayor volumen de residuos, que puede mejorar la estabilidad en las proteínas termofílicas mediante un empaquetamiento más eficiente y una entropía rotacional reducida de la forma desplegada; un aumento en la cantidad de aminoácidos aromáticos, especialmente residuos de tirosina que contribuyen a las interacciones catión- $\pi$ ; una disminución en el número de metionina y residuos polares no cargados que son aminoácidos termolábiles (Chen et al., 2009; Fields, 2001; Jeong et al., 2002; Moura et al., 2017; Roy & Sengupta, 2007; Tyndall et al., 2002; L. Wu et al., 2010; X. F. Zhang et al., 2019; X. X. Zhou et al., 2008).

A partir de la secuencia de Lip J2 se llevó a cabo una búsqueda de homología en la base de datos *Lipase Engineering Database*, y se utilizaron las secuencias de todas las lipasas encontradas que presentaran una homología superior al 50%, para la construcción de un árbol filogenético. Del análisis del árbol construido, quedó en evidencia que Lip J2 se encuentra separada de la lipasa con la que presentó mayor homología. Por lo que, en conjunto con la falta de identidad con otras lipasas constatada previamente, los resultados sugirieron que Lip J2 no pertenecía a ninguna de las familias de lipasas descritas hasta ese momento, constituyendo el primer miembro de una nueva familia de lipasas, la familia XVII. Los detalles del análisis estructural de Lip J2 y la caracterización

bioquímica fueron publicados en el año 2017 en la revista *Enzyme and Microbial Technology* bajo el título “A novel thermophilic and alcalophilic esterase from *Janibacter* sp. R02, the first member of a new lipase family (Family XVII).

## 2.5. Conclusiones del capítulo

En el presente capítulo se logró la purificación de LipJ2 a partir del sistema de expresión construido en *E. coli* ACIV, desarrollándose un protocolo de solubilización de ésta a partir de los cuerpos de inclusión producidos, y obteniéndose, aunque en bajos rendimientos, la enzima en forma soluble y activa. De esta forma se logró avanzar en la caracterización bioquímica de la misma. Las extraordinarias características bioquímicas demostradas por Lip J2 la posicionan como un biocatalizador muy interesante, con potencial de ser aplicado a diferentes procesos de interés industrial. La hipertermofilia demostrada (temperatura óptima 80 °C), así como su estabilidad frente a la temperatura posibilitaría la aplicación en la industria alimentaria donde enzimas con estas características son utilizadas para mejorar propiedades organolépticas y nutricionales de los alimentos, mientras que en la industria papelera enzimas con estas características se utilizan para la remoción del pitch durante el proceso de producción de la pasta de celulosa. Por otra parte, el hecho de ser una enzima alcalófila (pH óptimo entre 8,0 y 9,0) y resistente a pH alcalinos la hace atractiva para la industria de los detergentes para su incorporación como agente desengrasante, esta aplicación además puede ser potenciada por lo mencionado respecto al comportamiento frente a la temperatura. La activación frente a la presencia de algunas sales, mostrada por Lip J2 es una característica que no debe pasarse por alto; las características estructurales que proporcionan estabilidad en presencia de elevadas concentraciones de sales también están relacionadas con la estabilidad en condiciones de baja actividad de agua y frente a solventes orgánicos, como las que se emplean en numerosos procesos de síntesis de fármacos y química fina (Castilla et al., 2021).

El estudio de actividad llevado a cabo en las condiciones que se realiza la síntesis de biodiesel (temperatura, actividad y estabilidad en presencia de alcohol y glicerol) mostró que Lip J2 cuenta con las características necesarias para llevarla a cabo. Sin embargo, la marcada preferencia por ésteres de ácidos grasos de cadena corta como sustrato, que

la cataloga como una estearasa, la posiciona como más interesante para otro tipo de aplicaciones como las mencionadas más arriba. Adicionalmente, el tedioso proceso de purificación, y el bajo rendimiento de producción que se obtiene a partir de este, hace que sea un proceso muy costoso y por tanto no rentable para su implementación industrial. Por ello se considera que Lip J2 no es la enzima adecuada en la cual basar el desarrollo un biocatalizador inmovilizado para la síntesis de biodiesel, planteándose, como alternativa, el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados a partir de una lipasa comercial. Esto será desarrollado en el Capítulo 3.

## Capítulo 3

---



# Capítulo 3. Desarrollo de derivados inmovilizados de una lipasa de *Aspergillus niger* para su aplicación a la síntesis de biodiesel

## 3.1. Introducción

### 3.1.1. Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas se refiere al confinamiento espacial de las mismas, es una estrategia que se ajusta a los conceptos de la química verde ya que permite la reutilización del biocatalizador, y permitiría su recuperación una vez que el mismo deja de ser útil de forma que se realice una disposición final del mismo minimizando los riesgos de contaminación y conduciendo así al diseño de procesos más eficientes de menor impacto ambiental. El confinamiento de la enzima permite que puedan ser removidas del medio de reacción mediante filtración, centrifugación o separación magnética en caso de que sea posible. Al analizarlo desde el punto de vista del proceso, se trata de una solución práctica y sencilla para incorporar uno o más pasos catalíticos en procedimientos donde es necesario que el producto final se encuentre libre del catalizador, o sea necesario un fino control sobre la reacción; permitiendo el diseño de reactores de flujo continuo y la intensificación de los procesos catalíticos, mediante el diseño adecuado del sistema de biorreactor. (Datta, Christena, & Rajaram, 2013; Homaei, Sariri, Vianello, & Stevanato, 2013; Orrego et al., 2018; Romero-Fernández & Paradisi, 2020; Thangaraj & Solomon, 2019; Žnidaršič-Plazl, 2021). Mantener las enzimas inmovilizadas hace que se comporten como un catalizador heterogéneo ya que pueden ser fácilmente separadas del medio de reacción. La recuperación del catalizador por su parte permite que este sea reacondicionado para ser aplicado en tantos ciclos operativos como su vida útil lo permita (Bickerstaff, 1997; Schmid-Dannert & López-Gallego, 2019), aportando directamente a la eficiencia económica de los procesos (Basso & Serban, 2019).

Adicionalmente, para ciertas enzimas la inmovilización puede ser un proceso beneficioso ya que muchas veces se logra la estabilización de estas mediante la inmovilización, incluso el mejoramiento de sus características bioquímicas, posibilitando

su aplicación en condiciones de reacción que no toleraría la enzima soluble. (Basso & Serban, 2019; Guajardo, Ahumada, Domínguez de María, & Schrebler, 2019).

No obstante, la inmovilización de enzimas también puede tener algunas desventajas, dependiendo del soporte utilizado, puede incrementar el costo del catalizador desarrollado. Además, el proceso inmovilización de enzimas puede provocar una pérdida de actividad de la misma, debido a la interacción entre la enzima y el soporte donde puede modificarse la conformación de la primera. Dependiendo del tipo de sustrato sobre el que actúa la enzima en cuestión pueden existir problemas difusionales, al igual que si se seleccionan soportes porosos (Sheldon, 2007; Sheldon & van Pelt, 2013).

Gracias a los beneficios de la inmovilización de enzimas y teniendo en cuenta los puntos débiles que presenta dicho proceso, se han diseñado numerosos procesos industriales en los cuales está involucrado al menos un biocatalizador inmovilizado. Además esto se ha difundido a casi todas las áreas productivas, industria química, desarrollo de fármacos, industria textil, industria alimentaria, producción de detergentes, producción de biocombustibles, desarrollo de biosensores, industria biomédica, entre muchas otras (Basso & Serban, 2019; Bhosale, Rao, & Deshpande, 1996; Hosu, Mirel, Săndulescu, & Cristea, 2019).

El desarrollo de biocatalizadores inmovilizados es un proceso complejo que involucra diferentes áreas del conocimiento como la biología molecular, ingeniería de proteínas, ingeniería de materiales, biofísica, biocatálisis e ingeniería química (Benítez-Mateos & Contente, 2021). El éxito en el desarrollo de un biocatalizador inmovilizado está basado en el perfeccionamiento de protocolos luego de múltiples etapas de ensayo y error, ya que las herramientas para el diseño racional y predictivo de estos biocatalizadores son escasas. Si es posible tener en cuenta aquellos aspectos determinantes que *a priori* han demostrado ser claves en la construcción de biocatalizadores inmovilizados. Entre los más relevantes están la elección del soporte, la elección de la enzima y el tipo de interacción que tendrán entre ellos.

Existe una amplia variedad de soportes disponibles, los cuales se pueden dividir en dos grandes grupos, los soportes orgánicos (polímeros orgánicos) y los soportes inorgánicos, todos ellos pueden estar constituidos por diferentes compuestos que determinaran la

resistencia del soporte frente a las condiciones de reacción, resistencia mecánica, temperatura, pH o ataque por el solvente (Sakaguchi, Matsui, & Mizukami, 2005; Sheldon, 2007; Sheldon & van Pelt, 2013). Al analizar la interacción entre el soporte y la enzima en el derivado inmovilizado, existen diferentes posibilidades: i) adsorción física, mediada por enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas, interacciones hidrofóbicas; ii) entrapamiento, en estos casos la enzima queda retenida dentro de un polímero cuya estructura presenta poros de tamaño tal que permita el paso del sustrato y los productos pero no de la enzima; iii) entrecruzamiento, en este tipo de interacciones no hay un soporte, si no que las moléculas de enzima interactúan entre ellas a través de la aplicación de un agente entrecruzante; iv) interacción covalente, consiste en la formación de enlaces covalentes entre grupos reactivos presentes en la superficie de la enzima y grupos reactivos introducidos en la superficie del soporte (Bickerstaff, 1997; Datta et al., 2013; Guisan, Bolivar, López-Gallego, & Rocha-Martin, 2020; Hassan et al., 2019; Homaei et al., 2013; Thangaraj & Solomon, 2019; L. Xu, Ke, Huang, & Yan, 2016).

La agarosa es un soporte versátil con características excelentes para la inmovilización de enzimas. Entre las más destacadas se encuentran: i) su carácter hidrofílico; ii) la ausencia de grupos cargados, que previene las interacciones inespecíficas con la enzima a inmovilizar y los componentes del medio de reacción en el que se va a aplicar; iii) fácil derivatización, existen diversos métodos reportados para la introducción de una gran cantidad de grupos reactivos sobre este soporte; iv) su elevada porosidad, esto le confiere una elevada capacidad para inmovilizar proteína además de minimizar problemas difusionales de reactivos o productos; v) estabilidad estructural en un amplio rango de pH y frente a la presencia de diversos solventes orgánicos (Benítez-Mateos & Contente, 2021; Bickerstaff, 1997; Guisan et al., 2020; Zucca, Fernandez-Lafuente, & Sanjust, 2016).

La interacción covalente entre la enzima y el soporte es de carácter estable, permanente, previniendo de la liberación de la enzima al medio lo cual es muy deseable para ciertas aplicaciones, y generalmente le proporciona a la enzima un incremento de su estabilidad. Esta interacción puede ser uni- o multipuntual, entendiendo por unión multipuntual la formación de varios enlaces entre la proteína y el soporte. La interacción a través de múltiples enlaces con el soporte produce una rigidificación de la estructura

de la enzima logrando en muchas ocasiones, que la enzima sea más estable. Sin embargo, la inmovilización multipuntual de enzimas también presenta desventajas, durante el proceso de inmovilización se puede perder actividad enzimática debido a la rigidificación excesiva que sufre la estructura proteica cuando el número de enlaces establecidos con el soporte es demasiado elevado (Basso & Serban, 2019; Benítez-Mateos & Contente, 2021; Rodrigues, Berenguer-Murcia, Carballares, Morellon-Sterling, & Fernandez-Lafuente, 2021; Sheldon, 2007; Sheldon, Basso, & Brady, 2021).

En este capítulo se llevó a cabo la inmovilización de una lipasa de *Aspergillus niger* sobre agarosa funcionalizada con grupos cianatoéster o con grupos amino. Los grupos cianatoéster son introducidos mediante la reacción de los hidroxilos presentes en la agarosa utilizada como soporte con el agente cianilante tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridinio (CDAP) (Figura 3.1 A). Los grupos cianato éster introducidos pueden reaccionar con los grupos amino presentes en la superficie de la enzima de interés formando

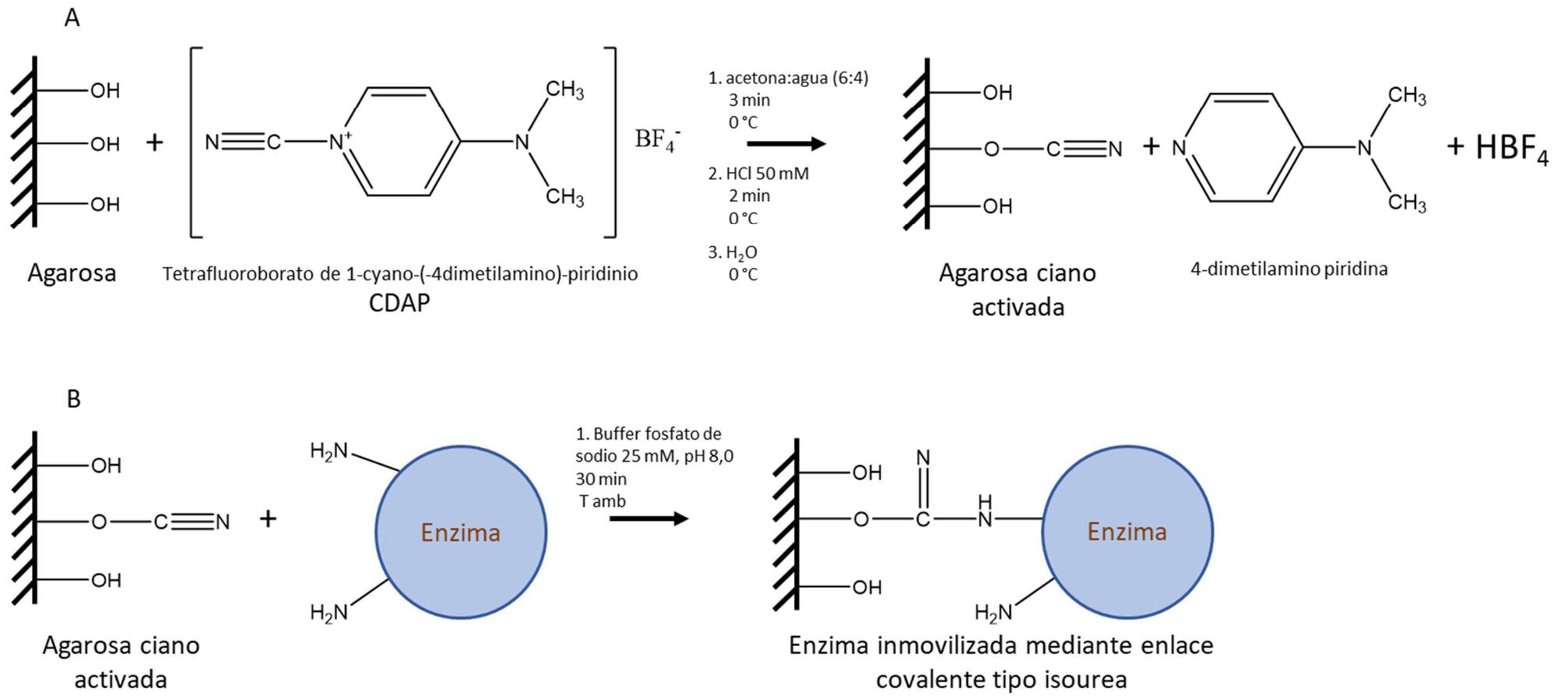


Figura 3.1. A, mecanismo de activación de la agarosa por el método CDAP para inmovilización de proteínas. B, inmovilización de enzimas en soporte cianato éster activado.

enlaces estables del tipo isourea, como se muestra en la (*Figura 3.1 B*). El procedimiento desarrollado es una variante de la técnica original, la cual utilizaba bromuro de cianógeno como agente cianilante, la sustitución de este por CDAP se basa en que este último es más estable y seguro de utilizar en el laboratorio, minimizando los riesgos para la salud del operario (Bickerstaff, 1997; Giacomini, Villarino, Franco-Fraguas, & Batista-Viera, 1998; Janson, 2012). La inmovilización de enzimas mediante esta técnica presenta dos grandes ventajas, la primera es la activación del soporte, la cual es sencilla y rápida, la segunda son las condiciones suaves en las cuales tiene lugar la inmovilización, ya que se lleva a cabo a pH 8,0 y temperatura ambiente. Mientras que la principal desventaja es que este tipo de soporte una vez activados no pueden ser almacenados, ya que el grupo cianato éster se hidroliza rápidamente dando lugar a un grupo carbamato no reactivo, lo que finalmente es una ventaja porque evita que sea necesario bloquear los grupos que no reaccionaron con la enzima.

Por otra parte, la funcionalización de la agarosa con grupos amino se lleva a cabo mediante tres pasos de síntesis como se muestra en la *Figura 3.2*, de esta forma se obtiene un soporte denominado monoaminometil-N-aminometil agarosa (MANA-agarosa). Este soporte permite la inmovilización de proteínas mediante la interacción con los grupos carboxilo presentes en la superficie de éstas, interactuando con grupos amino introducidos en el soporte (*Figura 3.3 A*) (Fernandez-Lafuente et al., 1993) La agarosa funcionalizada con grupos amino permite la formación de enlaces covalente (tipo amida) por interacción con los carboxilatos presentes en la superficie de la enzima provenientes de las cadenas laterales de los aminoácidos aspártico y glutámico. Sin embargo, para que ocurra la formación del enlace amida es necesario utilizar un agente de acoplamiento como son las carbodiimidas. Estas reaccionan con ácidos carboxílicos para formar una O-acilisourea altamente reactiva que se puede convertir en una amida mediante la reacción con una amina. La agarosa funcionalizada mediante esta técnica, presenta en su superficie grupos amino reactivos con un pKa cercano a 7,0 lo que permite la utilización de carbodiimida en condiciones óptimas de pH (entre 5,0 y 6,0), utilizando concentraciones de carbodiimida moderadas (entre 10 y 100 mM)(Bickerstaff, 1997). Adicionalmente esta técnica introduce un “brazo” espaciador entre el soporte y la enzima como se puede ver en la *Figura 3.2*, que minimiza la

interferencia estérica que pueda causar el soporte por la cercanía a la enzima, un hecho no menor si tenemos en cuenta que el gran tamaño de los sustratos de las lipasas.

.

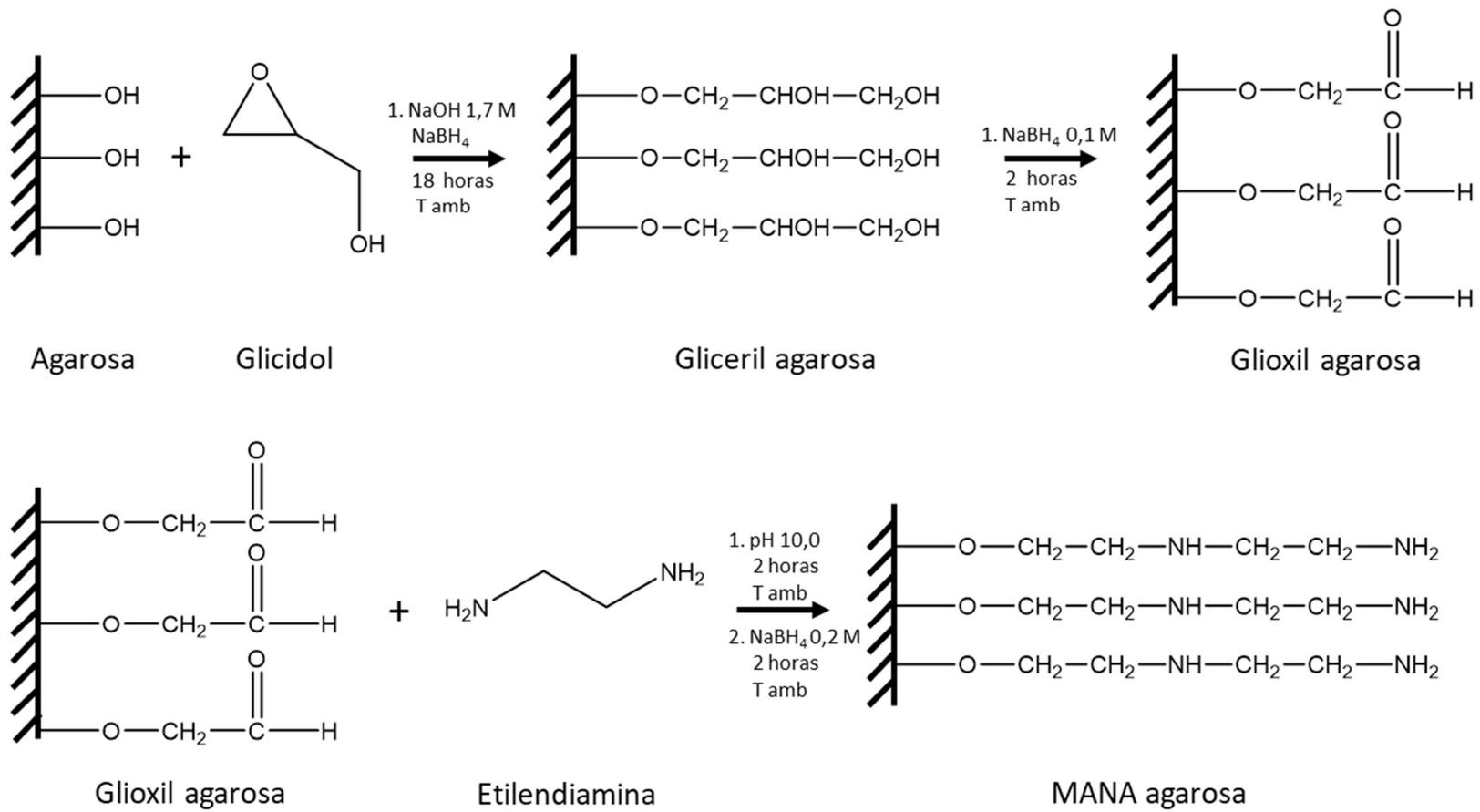


Figura 3.2. Síntesis de Mana-agarosa.

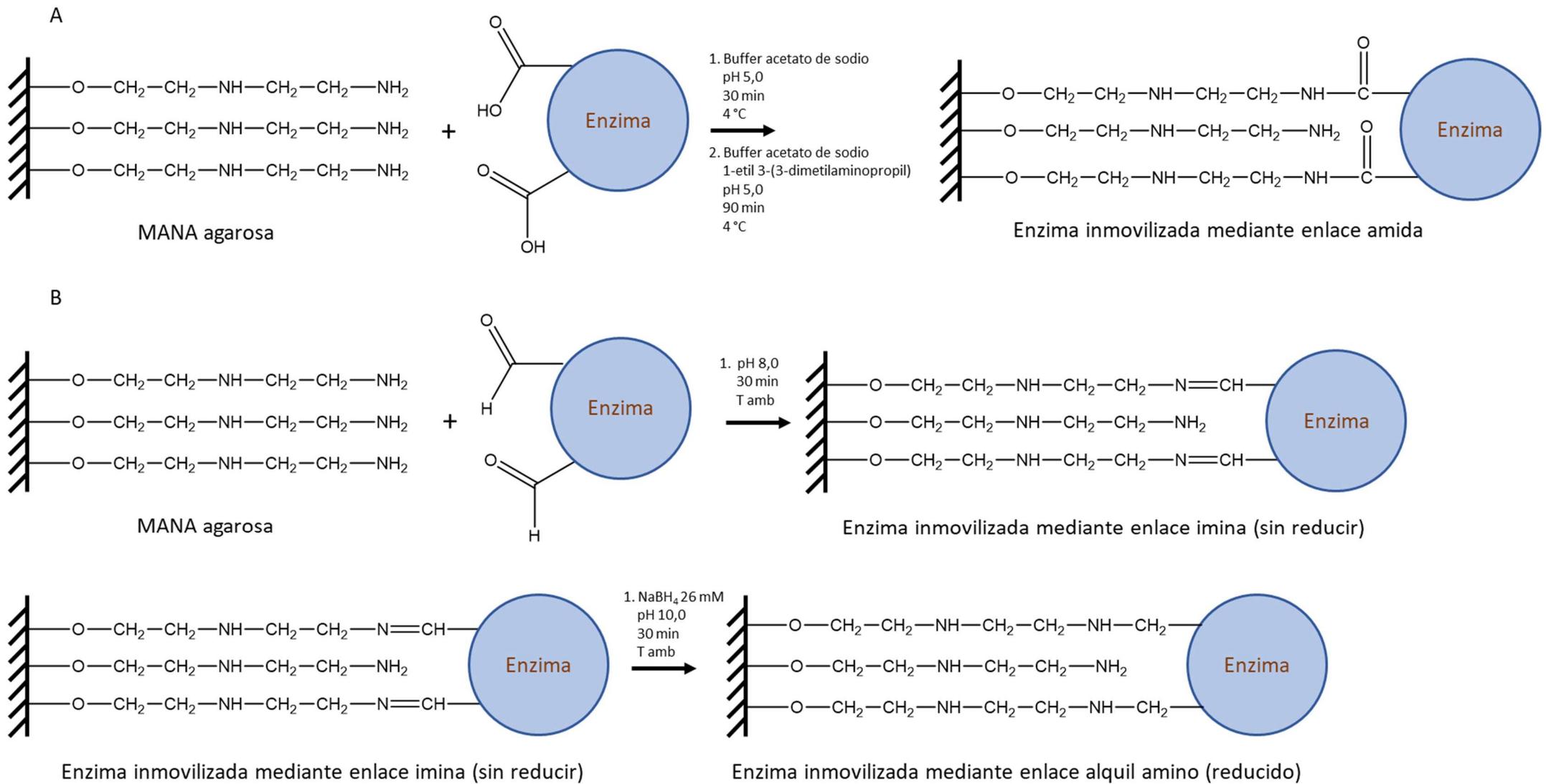


Figura 3.3. Inmovilización de enzimas sobre MANA-agarosa. A, a través de grupos carboxilato. B, a través de grupos aldehído

Alternativamente la inmovilización sobre esta matriz se puede llevar a cabo mediante la interacción de los grupos amino del soporte con grupos aldehído generados en la enzima mediante oxidación de los azúcares presentes en su superficie (*Figura 3.3 B*). La inmovilización mediante esta estrategia se lleva a cabo en condiciones amigables para la estabilidad de la enzima, conduciendo a la formación de una base de Schiff, este enlace es lábil por lo que es necesario un paso de reducción para que se de la formación del enlace alquil-amina estable que garantizara que la enzima no se libere del soporte.

### 3.1.2. *Aspergillus niger* y sus lipasas

*Aspergillus niger* es uno de los microorganismos más estudiados y más requerido respecto a las diferentes lipasas que produce. Diferentes cepas son productoras de enzimas con diferentes características bioquímicas, e incluso una misma cepa es capaz de producir varias lipasas con diferente preferencia de sustrato. A modo de ejemplo la cepa de *A. niger* MYA135 es capaz de producir 3 lipasas diferentes en función de la composición del medio de cultivo (Pera, Romero, Baigori, & Castro, 2006; Romero et al., 2012). Las lipasas producidas por este género tienen un tamaño entre 11 y 67 kDa, todas son monoméricas y se producen de forma extracelular. Respecto a su comportamiento frente al pH, suelen ser acidófilas con pH óptimo entre 2,5 y 7,0, mientras que frente a la temperatura no se las puede agrupar en una categoría ya que presentan máximos de actividad en un amplio rango de temperaturas (Ellaiah, Prabhakar, Ramakrishna, Thaeer Taleb, & Adinarayana, 2004; Mhetras, Bastawde, & Gokhale, 2009; SHU, YANG, & YAN, 2007; Sugihara, Shimada, & Tominaga, 1988).

La elección de una lipasa de *A. niger* para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados para su aplicación a la síntesis de biodiesel, se basó en diversos reportes los cuales demostraron su capacidad para conducir la síntesis de biodiesel. Adicionalmente la enzima se encuentra disponible comercialmente lo que supone un suministro constante y homogéneo de enzima para la síntesis de derivados inmovilizados (El-Batal, Farrag, Elsayed, & El-Khawaga, 2016; El-Ghonemy et al., 2021; Guldhe et al., 2016; Mhetras et al., 2009; Romero et al., 2012). Particularmente se utilizó el preparado comercial AMANO A 12, que es un extracto proteico enriquecido en actividad lipolítica.

## 3.2. Objetivos del capítulo

### 3.2.1. Objetivo general

Obtener derivados inmovilizados de la lipasa de *Aspergillus niger*, que presenten características adecuadas para ser aplicados a la síntesis de biodiesel.

### 3.2.2. Objetivos específicos

- Desarrollar protocolos de purificación para la lipasa de interés.
- Evaluar la estabilidad de la enzima purificada en condiciones de inmovilización.
- Aplicar la lipasa AMANO purificada a reacciones de síntesis de biodiesel.
- Explorar diferentes químicas de inmovilización para la lipasa AMANO purificada.
- Caracterizar los derivados inmovilizados desarrollados, en función de la aplicación propuesta.

## 3.3. Materiales y métodos

### 3.3.1. Definición de unidad de enzima para la lipasa de *Aspergillus niger* purificada

Cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de pNP por minuto a pH 7,0 y temperatura ambiente.

### 3.3.2. Ensayos de actividad frente a pNP butirato

Los ensayos de actividad se llevaron a cabo a temperatura ambiente, se realizaron triplicados de cada medida. La mezcla reactiva utilizada se compuso de 2,0 mL de 0,5 mM pNP butirato en buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0 y 50  $\mu\text{L}$  de una dilución adecuada de enzima en el mismo buffer; se midió la velocidad de liberación de pNP espectrofotométricamente a 348 nm usando celdas de 1cm de camino óptico. El coeficiente de absortividad para el pNP a 348 nm es  $5.6 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 3.3.3. Purificación de la lipasa de *Aspergillus niger*

Se partió de 10 mL de una solución 100 mg/mL del liofilizado AMANO A12 en buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0, la cual se sometió a una precipitación con sulfato de amonio al 25% de saturación, este proceso se realizó con agitación magnética constante en baño de hielo. Se incubó 18 horas a 4 °C, posteriormente se centrifugó la muestra a

10000 rpm y 4 °C durante 10 minutos y se descartó el precipitado. El sobrenadante se diluyó al medio en buffer fosfato de sodio 25 mM suplementado con sulfato de amonio 25 % de saturación, pH 7,0. Los 20 mL se ofrecieron a una columna HiTrap Octyl FF 5mL (GE Healthcare) equilibrada en el mismo buffer, la muestra se suministró a razón de 0,5 mL/minuto, el proceso se llevó a cabo en un ÄKTA Purifier. Se lavó la proteína no unida con dos volúmenes de columna de buffer fosfato de sodio 25 mM suplementado con sulfato de amonio 25% de saturación, pH 7,0. La proteína adsorbida en la columna se eluyó con buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0, se recogió el eluido en fracciones de 1mL, y se evaluó actividad lipasa mediante la técnica descrita en 3.3.3. Se combinaron las fracciones con actividad lipasa (6 fracciones), y se realizó una cromatografía de exclusión molecular, aplicando 2,5 mL a una columna comercial PD-10, y eluyendo en 3,5 mL de buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0, según las recomendaciones del fabricante. El eluido de la gel filtración, libre de sulfato de amonio, se incubó en batch con 1 g de dietilaminoetil agarosa (DEAE) *suction dried* (agarosa húmeda, secada por filtración a vacío) equilibrada en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0, a 4 °C durante una hora. Posteriormente se removió el percolado, se realizaron dos lavados en batch con 4 mL de buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0, a 4°C durante 30 minutos cada vez, para remover la proteína débilmente unida. Se realizó la elución en columna mediante el agregado de 2,0 mL de buffer fosfato de sodio 25 mM suplementado con cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,0. Finalmente, el eluido se dializó tres veces contra 1 L de buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0, 2 horas a 4 °C cada vez, y se liofilizó para su almacenamiento a -20 °C. Todo el proceso de purificación fue evaluado mediante PAGE-SDS. La enzima purificada fue denominada lipasa AMANO

#### 3.3.4. Estudio del efecto del pH sobre la actividad enzimática

Para estudiar el efecto del pH en la actividad enzimática se siguió el procedimiento descrito en la sección 3.3.2 sustituyendo el buffer fosfato por buffer tris-bórico-acético (ATB) 50 mM a diferentes pH.

### 3.3.5. Estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

Para estudiar el efecto de la temperatura en la actividad enzimática se siguió el procedimiento descrito en la sección 3.3.2 modificando la temperatura de reacción en cada caso. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro provisto de una camisa calefactora en la celda de medida.

### 3.3.6. Evaluación de la estabilidad frente a la temperatura

Se incubaron 3 UE/mL de la lipasa AMANO en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0 durante una hora a cada temperatura evaluada, pasado ese tiempo se procedió a cuantificar la actividad remanente en las condiciones descritas en 3.3.2.

### 3.3.7. Evaluación de la estabilidad frente al pH

Se incubaron 3 UE/mL de la lipasa AMANO en buffer ATB 50 mM a diferentes pH durante 24 horas a temperatura ambiente. Luego de la incubación se realizó el ensayo de actividad en las condiciones establecidas en 3.3.2.

### 3.3.8. Evaluación de la estabilidad enzimática en presencia de hexano

Se incubó 5 mg de la lipasa AMANO liofilizada en 1,0 mL de hexano saturado en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0 (3 UE/mL), durante 96 horas a temperatura ambiente. El liofilizado no es soluble en hexano, por lo que se evaluó la actividad de la enzima en suspensión. Se midió actividad enzimática a diferentes tiempos de incubación según el protocolo descrito en 3.3.2.

### 3.3.9. Ensayo de síntesis de biodiesel

La mezcla de reacción se compuso de 0,5 g de aceite de oliva (75% trioleína), 160 µL de etanol y 20 mL de hexano saturado en buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0. En estas condiciones la relación molar etanol: trioleína fue 6:1 (2:1 equivalentes de reacción). El ensayo de síntesis de biodiesel estándar se llevó a cabo incubando 5 mg de la lipasa AMANO liofilizada en 1 mL de mezcla de reacción (3 UE/mL), durante 48 horas a 40 °C, con agitación orbital vigorosa.

### 3.3.10. Síntesis de glioxil-agarosa

A una alícuota de 50 g de agarosa 4B (Sepharose 4B GE Healthcare) *suction dried* lavada con agua destilada se le adicionaron 50 mL de borohidruro de sodio 37,6 mM en hidróxido de sodio 1,7 M, y 36 mL de glicidol, la mezcla de reacción se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente, manteniendo agitación suave constante durante todo el proceso. Al cabo de este tiempo la suspensión de gel se filtró a vacío en embudo con placa de vidrio sinterizado y el gel obtenido se lavó con abundante agua destilada. Posteriormente se procedió con la etapa de oxidación, para lo cual se suspendieron los 50 g de la agarosa activada en 698 mL de agua destilada y se le agregaron 58 mL de metaperyodato de sodio 0,1 M; esta suspensión se incubó a temperatura ambiente con agitación suave continua, durante 2 horas. Pasado ese tiempo se filtró a vacío en embudo con placa de vidrio sinterizado y el gel glioxil-agarosa obtenido se lavó con abundante agua destilada. Se almacena como *suction dried* a 4 °C.

La titulación de los grupos glioxil se llevó a cabo mediante un método espectrofotométrico a 419 nm. Se establece el blanco de medida con una solución 1:1 v/v de yoduro de potasio y bicarbonato de sodio saturado. En la cubeta de medida se agregan 3,0 mL de una solución 1:1 v/v de yoduro de potasio y bicarbonato de sodio saturado y 0,2 mL de metaperyodato de sodio 0,1 M en agua, y se mide la absorbancia. Se procede de igual forma con la muestra de interés, se agregan 3,0 mL de una solución 1:1 v/v de yoduro de potasio y bicarbonato de sodio saturado y 0,2 mL de sobrenadante de la oxidación del soporte, y se mide la absorbancia, se compara la absorbancia la obtenida para la solución de metaperyodato de sodio 0,1 M y se realiza el cálculo de metaperyodato consumido en el proceso de oxidación (Bickerstaff, 1997; Guisán et al., 2003).

### 3.3.11. Síntesis de MANA-agarosa

Para la síntesis del gel MANA-agarosa se suspendieron 50 g de glioxil-agarosa *suction dried* (conteniendo 58  $\mu$ moles de grupos glioxil/g de gel *suction dried*) en 310 mL de etilendiamina 2 M, pH 10,0 y se incubaron con agitación constante a temperatura ambiente, durante dos horas. Posteriormente se agregaron 3,1 g de borohidruro de sodio, y se continuó con la agitación a temperatura ambiente durante dos horas. Pasado

ese lapso se filtró a vacío en embudo con placa de vidrio sinterizado y se lavó el gel MANA-agarosa con 1 L de buffer acetato de sodio 0,1 M suplementado con cloruro de sodio 1 M, pH 4,0. Este paso se repitió con 1L de buffer borato de sodio 0,1 M suplementado con cloruro de sodio 1 M, pH 9,0 y con 1 L de agua destilada. Como último paso se filtró a vacío en embudo con placa de vidrio sinterizado y se almacenó el gel amino-agarosa *suction dried* a 4 °C.

### 3.3.12. Inmovilización sobre MANA-agarosa

#### 3.3.12.1 Unión a través de los grupos carboxilato presentes en la proteína

Se preparó una solución conteniendo 2,5 UE/mL de lipasa AMANO en buffer acetato de sodio 25 mM, pH 5,0 y se incubó con soporte MANA-agarosa (conteniendo 58  $\mu$ moles de grupos amino/g de gel *suction dried*), en una relación 10:1 v/v. Se corroboró que el pH de la suspensión se mantuviese en 5,0 y se incubó a temperatura ambiente con agitación en rototorque constante. Se evaluó la actividad enzimática remanente en el sobrenadante a intervalos de 30 minutos, hasta que la misma fue constante (aproximadamente 90 minutos). Se agregó 1-etil 3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) en cantidad suficiente para alcanzar una concentración de 10 mM en la suspensión, se verificó que el pH se mantenía en 5,0 y se incubó a temperatura ambiente con agitación mecánica constante, durante 90 minutos. Se separó el derivado inmovilizado mediante filtración en embudo con placa de vidrio sinterizado y se lavó con: i) un volumen (10 veces el volumen de agarosa activada utilizada) de buffer carbonato/bicarbonato de sodio 0,1 M, NaCl 1M, pH 9,0; ii) un volumen de buffer acetato de sodio 0,1 M pH 5,0; iii) abundante agua destilada. Finalmente, el derivado inmovilizado se lavó con buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0 y se filtró a vacío en embudo con placa de vidrio sinterizado hasta sequedad y se almacenó a 4 °C.

#### 3.3.12.2 Unión a través de grupos aldehídos generados por oxidación de los azúcares expuestos en la superficie de la enzima

La oxidación de los azúcares se llevó a cabo incubando una solución de lipasa AMANO (no superar las 6 UE/mL) en buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 8,0, con metaperyodato de sodio hasta una concentración final de 1,0 mM, en baño de hielo, durante 30

minutos. A cabo de este tiempo se gel filtró la solución en columna PD 10 según el protocolo proporcionado por el fabricante (Healthcare, n.d.) utilizando buffer fosfato de sodio 25 mM pH 8,0, para remover el exceso de metaperyodato de sodio. A la solución de proteína gel filtrada se le midió actividad enzimática según lo descrito en 3.3.3. Esta solución de enzima se incubó con soporte MANA-agarosa (conteniendo 58  $\mu$ moles de grupos amino/g de gel *suction dried*) en una relación 10:1 v/v, con agitación moderada en rototorque, a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo se separó el derivado inmovilizado mediante filtración en embudo con placa de vidrio sinterizado, y se lavó con buffer fosfato de sodio 25 mM pH 8,0, Por último, se realizó la etapa de reducción de la base de Schiff formada entre el aldehído de los azúcares oxidados en la proteína y los grupos amino del soporte. Para ello se incubó el derivado inmovilizado con una solución de borohidruro de sodio 1,0 mg/mL en buffer carbonato de sodio 50 mM a pH 10,0, con agitación moderada en rototorque, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se separó el derivado inmovilizado reducido mediante filtración en embudo con placa de vidrio sinterizado, y se lavó exhaustivamente con buffer fosfato de sodio 25 mM pH 8,0, luego se llevó a sequedad mediante filtración y se almacenó a 4 °C.

### 3.3.13. Síntesis de agarosa activada con agentes cianilantes

Se lavaron 3 g de agarosa 4B con: i) 50 mL de agua destilada, ii) 50 mL de acetona: agua (3:7 v/v), iii) 50 mL de acetona: agua (6:4 v/v), todas las soluciones fueron previamente enfriadas a 4 °C; entre cada lavado se filtró a vacío en embudo con placa de vidrio sinterizado. Se transfirió la totalidad de la agarosa a un Erlenmeyer (pequeño) y se agregó 3 mL de una solución de acetona: agua (6:4 v/v) y se agregó gota a gota, 2 mL de una solución conteniendo 75 mg de CDAP disueltos en acetona: agua (6:4 v/v) con agitación vigorosa constante (el tiempo estimado para la adición es 3 minutos). A continuación, se agregó gota a gota 360  $\mu$ L de trietilamina 0,2 M (el tiempo estimado de la adición es 2 minutos), manteniendo la agitación vigorosa. Luego de 3 minutos se transfirió la totalidad de la mezcla de reacción a un recipiente con 50 mL ácido clorhídrico 0,05 M. Luego de no más de 2 minutos el gel se filtró a vacío en embudo con placa de vidrio sinterizado. Rápidamente se lavó con 50 mL de agua destilada. Es

importante destacar que todo el proceso se llevó a cabo en baño de hielo y los reactivos empleados fueron pre-enfriados a 4 °C. Los tiempos de adición indicados deben ser respetados rigurosamente.

#### 3.3.14. Inmovilización sobre agarosa cianato éster activada

Para la inmovilización mediante este método, se activó la agarosa en el momento de ser utilizada, como fue descrito en el ítem anterior, e inmediatamente finalizada la activación se adicionó la solución de lipasa AMANO conteniendo 2,1 UE/mL en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 8,0. La suspensión se incubó a temperatura ambiente con agitación mecánica moderada y constante en rotatorque. Se evaluó la actividad remanente en el sobrenadante de inmovilización cada 30 minutos y cuando la misma fue menor al 10 % de la ofrecida, se finalizó el proceso de inmovilización. Para ello se separó el derivado inmovilizado mediante filtración con embudo con placa de vidrio sinterizado y se lavó con buffer fosfato de sodio 25 mM pH 8,0, se llevó a sequedad mediante filtración y se almacenó a 4 °C.

#### 3.3.15. Caracterización de los derivados inmovilizados de lipasa AMANO

##### 3.3.15.1 Ensayos de actividad frente a pNP butirato

Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en espectrofotómetro que tiene acoplado a la celda de medida un dispositivo que permite agitación magnética, a temperatura ambiente y se realizaron triplicados de cada medida. La mezcla reactiva utilizada se compuso de 2,0 mL pNP butirato 0,5 mM en buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0, y 100 µL de una suspensión 100 mg *suction dried* del derivado inmovilizado a ensayar/ mL del mismo buffer. Se midió la velocidad de liberación de pNP espectrofotométricamente a 348 nm usando celdas de 1cm de camino óptico. El coeficiente de absortividad para el pNP a 348 nm es  $5,6 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

##### 3.3.15.2 Estudio de la estabilidad de los derivados inmovilizados frente a la temperatura

Se preparó una suspensión 100 mg *suction dried* de derivado inmovilizado a estudiar/mL de buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0, se separó una alícuota de suspensión

correspondiente a 4 UE/mL y se incubó a 40 °C durante 96 horas. A tiempos intermedios se tomaron alícuotas de la suspensión a las cuales se evaluó la actividad enzimática remanente según el procedimiento descrito en 4.3.6.1. En paralelo y como control se incubó una alícuota de enzima en solución conteniendo la mismas UE/mL que la suspensión de derivado inmovilizado. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

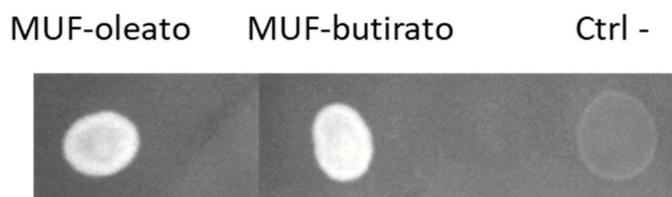
#### 3.3.16. Cromatografía gaseosa

El análisis cuantitativo de hidrólisis de trioleína se llevó a cabo por cromatografía gaseosa en un cromatógrafo Agilent Technologies 7820<sup>a</sup> GC dotado con una columna DB-225 y FID. Las condiciones operativas fueron: carrier N<sub>2</sub> 0,2 mL/min y la temperatura del inyector y detector fue 250 °C. Se empleó el siguiente programa de temperatura: temperatura inicial 40 °C durante 0,5 minutos, incremento de 25 °C/minuto hasta 195 °C, incremento de 3 °C/min hasta 205 °C, incremento de 8 °C/min hasta 230 °C y permanencia a esa temperatura durante 10 minutos.

### 3.4. Resultados y discusión

#### 3.4.1. Purificación de la lipasa de *Aspergillus niger*

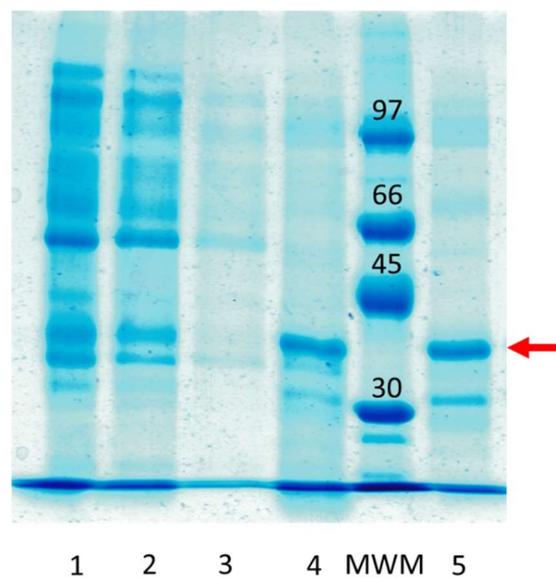
Se partió de la lipasa AMANO A 12 que según la empresa que la comercializa es un preparado enzimático enriquecido en lipasa de *Aspergillus niger* (AMANO Enzymes). Según lo reportado previamente esta enzima es activa frente a ésteres carboxílicos de cadena larga, además estructuralmente se trata de una enzima monomérica y tiene un peso molecular de 35 kDa (Fernández-Lorente et al., 2005). Con el fin de corroborar lo reportado se llevó a cabo un ensayo de actividad cualitativo en las condiciones descritas en 1.3.2.2 utilizando MUF-butirato y MUF-oleato como sustratos. Como se puede apreciar en la *Figura 3.4*, el preparado mostró actividad frente a ambos sustratos. Además se realizó una PAGE-SDS y se constató que el preparado comercial es una mezcla compleja de proteínas (*Figura 3.4*, carril 1). Por ello se planteó la purificación de la enzima responsable de la actividad deseada, con el fin de desarrollar un biocatalizador inmovilizado en base a una enzima pura o una preparación concentrada en la actividad de interés.



*Figura 3.4. Evaluación cualitativa de la actividad del preparado AMANO A12, frente a MUF-oleato y MUF-butirato. Ctrl - corresponde al control negativo de reacción.*

Se desarrolló el protocolo de purificación descrito en 3.3.3, y fue evaluado mediante la cuantificación de la concentración de proteína por la técnica de Biuret (Beyer, 1983), determinación de la actividad lipasa según el procedimiento descrito en 3.3.2 y por PAGE-SDS como se muestra en la *Figura 3.5*. Se partió del preparado comercial liofilizado, el cual fue disuelto en buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0 y la solución obtenida se precipitó con sulfato de amonio al 25% p/v. Esta concentración de agente caotrópico fue seleccionada en base a la experiencia previa reportada por Sugihara *et al.* en 1988, por lo allí expuesto queda claro que no se buscó la precipitación de la proteína de interés, sino de proteínas contaminantes, como se puede apreciar en la

comparación de los carriles 1 y 2 de la *Figura 3.5*; además este paso prepara a la muestra para el siguiente paso de cromatografía de afinidad por interacciones hidrofóbicas (HIC)(Sugihara et al., 1988). La presencia del sulfato de amonio presente en la muestra es beneficioso para el proceso, ya que al ser un agente caotrópico favorece la interacción entre las proteínas y las matrices del tipo hidrofóbicas (Healtcare, 2015). Por lo que al sobrenadante de la precipitación con sulfato de amonio se le realizó una HIC en Hi Trap Octyl-Sepharose FF, donde se constató la adsorción de varias proteínas como se aprecia en el carril 4 de la misma figura. En el carril 3 correspondiente al percolado de la HIC se aprecian diversas bandas de proteína que no interactúan con la matriz hidrofóbica, destacándose la ausencia de la banda de peso molecular entre 30 y 45 kDa, la cual es



*Figura 3.5. PAGE-SDS del proceso de purificación de la lipasa de Aspergillus niger, revelado con Coomassie coloidal. Carril 1: solución 100 mg de preparado enzimático AMANO A 12/mL, carril 2: sobrenadante de la precipitación con sulfato de amonio al 25% p/v, carril 3: percolado de la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), carril 4: pool del eluido de HIC, carril 5: eluido de la cromatografía de intercambio aniónico, MWM: marcador de peso molecular (kDa).*

posteriormente purificada. La elución de la proteína unida se realizó por remoción del sulfato de amonio del buffer, de manera de debilitar las interacciones hidrofóbicas, promoviendo la desorción de la enzima.

De la comparación entre las muestras sembradas en los carriles 2 y 3 se aprecia que varias de las bandas presentes en el aplicado no se adsorben a la matriz y percolan.

Mientras que en el carril 4 correspondiente al pool del eluido de HIC, si bien se ven varias bandas, se observa claramente que una de ellas se encuentra en mayor proporción.

Tabla 3.2. Evaluación del proceso de purificación de la lipasa AMANO.

Etapa de purificación	Actividad específica (UE/mg)	Factor de purificación	% de recuperación
Sobrenadante de precipitación con sulfato de amonio 25%	$(1,4 \pm 0.1) \times 10^2$	1,0	100
Cromatografía de interacción hidrofóbica	$(6,3 \pm 2,9) \times 10^2$	$4,5 \pm 2,3$	$25,0 \pm 2,6$
Cromatografía de intercambio aniónico	$(8,3 \pm 0.8) \times 10^2$	$5,9 \pm 0,4$	$8,8 \pm 3,2$

Los datos aquí expresados corresponden a la evaluación de cinco repeticiones del proceso de purificación.

Como último paso de purificación se realizó una cromatografía de intercambio aniónico, con el fin de concentrar aún más la proteína de interés y remover proteínas contaminantes que aún persistieran. Al comparar los carriles 4 y 5 se aprecia que la mayoría de las proteínas contaminantes aún persisten en el eluido de la cromatografía de intercambio aniónico. Si bien en la *Figura 3.5* no se aprecia que la proteína de interés se haya purificado respecto a las otras contaminantes, si se observa en la *Tabla 3.1* donde se muestra la evaluación del proceso de purificación en función de la actividad específica luego de cada etapa, el factor de purificación y el rendimiento del proceso.

El factor de purificación fue calculado en base a la actividad específica en cada paso mientras que el porcentaje de recuperación se calculó en base a las UE totales presentes en cada fracción, en ambos casos la comparación fue respecto a los valores obtenidos para la muestra aplicada a la cromatografía de afinidad hidrofóbica.

La globalidad del proceso de purificación fue analizada también mediante balance de masa el cual mostró una recuperación de  $94 \pm 10$  % de la proteína de la que se partió (proteína presente en el preparado en polvo AMANO A12), y evaluado en términos de actividad se recuperó el  $34 \pm 1$  % de la actividad inicial. Esto nos indicó que el protocolo de purificación desarrollado fue eficiente ya que no se pierde proteína durante el desarrollo del mismo, pero las condiciones en las que se llevó a cabo afectaron negativamente la actividad lipasa evaluada. La pérdida de actividad puede deberse a diversos factores como la formación de pequeños agregados solubles entre moléculas de enzima que dificulten el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima, este efecto

ya ha sido constatado y reportado para las lipasas de *Bacillus thermocatenuatus* y *Thermosyntropha lipolítica* (Salameh & Wiegel, 2010; Schmidt-Dannert, Rúa, Atomi, & Schmid, 1996). También puede deberse a la remoción de algún componente de la mezcla inicial que puede ser importante para la actividad enzimática, como han demostrado ser algunos metales en las lipasas de *Geobacillus thermocatenuatus* o *Janibacter* R02 (Castilla et al., 2017; Cedrés González, 2021). Otra alternativa es la desnaturalización de la enzima por la temperatura, ya que el proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente, esta última hipótesis contrapone los resultados reportados por algunos autores que destacan la buena estabilidad de las lipasas fúngicas frente a la temperatura y con los resultados que se muestran más adelante en este capítulo en la sección 3.2.4.1 para esta lipasa en particular (Fukimoto, Iwai, & Tsujisaka, 1963; A. K. Sharma, Sharma, & Saxena, 2016; A. K. Singh & Mukhopadhyay, 2012).

El protocolo de purificación desarrollado fue exitoso para el objetivo planteado ya que la muestra final obtenida se encuentra casi seis veces más concentrada en actividad lipasa respecto a la muestra aplicada a la cromatografía de interacción hidrofóbica; teniendo en cuenta lo observado en el carril 5 de la *Figura 3.4* podemos decir que la banda de PM entre 30-45 kDa (de aproximadamente 35 kDa,) si bien no es la única presente en la muestra, es la mayoritaria. Por lo que logramos obtener una muestra concentrada en la proteína de interés para el desarrollo de derivados inmovilizados de esta enzima, la cual pasó a llamarse lipasa AMANO.

### 3.4.2. Caracterización bioquímica de la lipasa AMANO

Para diseñar y desarrollar derivados inmovilizados de la lipasa AMANO, fue necesario realizar una caracterización parcial de la enzima purificada, para corroborar que no hubiese cambios respecto a las características declaradas por el proveedor. Se decidió evaluar aquellos parámetros que fueran relevantes para el desarrollo de derivados inmovilizados y su posible aplicación a la síntesis de biodiesel.

#### 3.4.2.1 Estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad de la lipasa AMANO

Se estudió el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática según lo descrito en 3.3.7. Como se aprecia en la *Figura 3.6*, la actividad aumenta conforme lo hace la

temperatura dentro del rango de 30 a 55 °C. A 55 °C se observa un máximo de actividad aparente, el cual representa 1,8 veces la observada a 30 °C; para las temperaturas mayores estudiadas la variación en la actividad es mínima, aunque levemente inferior a la observada a 55 °C. Por lo antes mencionado podemos afirmar que la temperatura óptima de la enzima se encuentra en el rango entre 55 y 66 °C, lo cual está en consonancia con la temperatura óptima para otras lipasas del género (Pera et al., 2006).

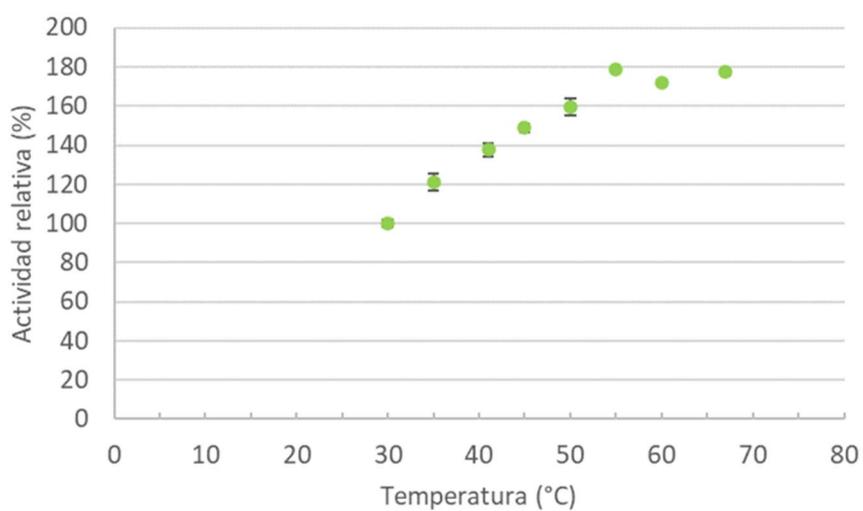


Figura 3.6. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática. La actividad se midió utilizando pNP butirato como sustrato, en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0. Se determinó la actividad relativa respecto a la observada a 30 °C.

#### 3.4.2.2 Evaluación de la estabilidad frente a la temperatura

Las temperaturas para realizar el estudio de estabilidad fueron seleccionadas en función de la aplicación de la enzima en la síntesis de biodiesel. Se realizó el estudio de la estabilidad a 40 y 50 °C teniendo en cuenta que el aumento de la temperatura en la reacción de síntesis de biodiesel provocaría un aumento de la actividad de la enzima y además mejoraría la fluidez de la mezcla de reacción. Para ello se incubó por triplicado una alícuota de enzima conteniendo 3 UE/mL y se le midió actividad enzimática remanente periódicamente. Como se puede apreciar en la *Figura 3.7* la lipasa AMANO cuando es incubada a 40 °C, sufre una pérdida de actividad del 40 % en las primeras 3 horas de incubación y posteriormente la misma se atenúa, reteniendo el 50 % de la actividad inicial luego de 95 horas de incubación.

Este comportamiento ha sido reportado previamente para diferentes enzimas, la disminución de la actividad enzimática en función del tiempo responde al menos a dos constantes de inactivación, la primera de ellas mucho mayor que la segunda, explicando la gran pérdida de actividad que se aprecia en las primeras horas del ensayo (Henley & Sadana, 1984; Mhetras et al., 2009). Luego de ese tiempo la enzima alcanza un estado enzimático de menor actividad que el inicial, donde la inactivación está gobernada por una segunda constante de menor magnitud, lo que conduce a una pérdida de actividad muy lenta. Los estudios realizados a 50 °C muestran que la pérdida de actividad inicial a esta temperatura es del 65 %, y esta continúa descendiendo hasta un 22 % de actividad remanente luego de 95 horas de incubación.

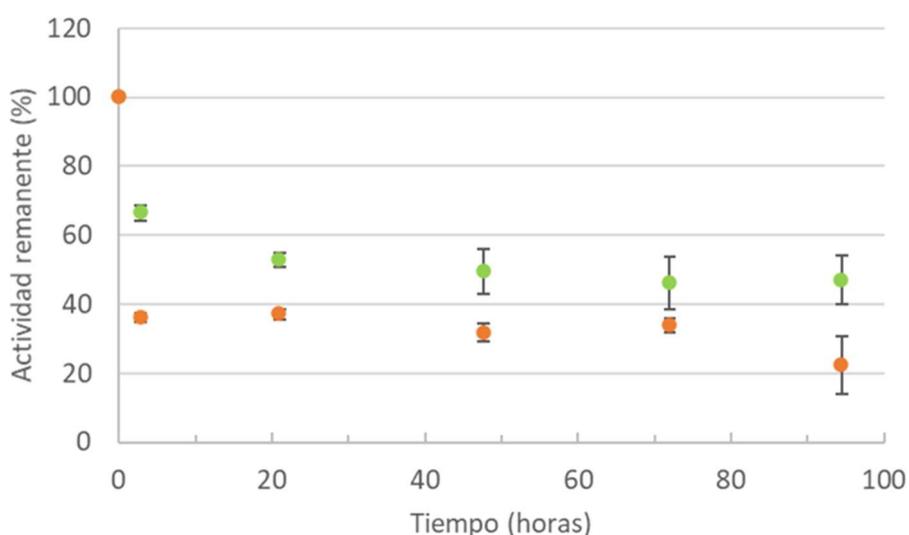


Figura 3.7. Ensayo de estabilidad frente a la temperatura para la lipasa AMANO. En verde se muestra la estabilidad a 40 °C, en naranja se muestra la estabilidad a 50 °C.

### 3.4.2.3 Evaluación de la estabilidad enzimática en presencia de hexano

Teniendo en cuenta que la reacción de síntesis de biodiesel, descrita en 3.3.9, se realiza en presencia de hexano saturado en buffer fue necesario comprobar la estabilidad de la lipasa AMANO en esta condición. Para ello se incubó por triplicado durante 96 horas una alícuota de lipasa AMANO en hexano saturado en buffer a temperatura ambiente, donde se observó que la actividad remanente luego de 24 horas fue  $86,0 \pm 6,5$  % y luego de 96 horas disminuyó hasta  $71,0 \pm 4,8$  %. Si bien la pérdida de actividad observada es baja, la disminución de la actividad con el tiempo podría ser un factor que afectara la

capacidad de conversión en la reacción de interés. La estabilidad mostrada frente a hexano también ha sido reportada para diversas lipasas y está directamente relacionada con la estructura de esta familia de enzimas (Reetz, Soni, Fernández, Gumulya, & Carballeira, 2010; Romero et al., 2012). Incluso para lipasas cuya estructura haya sido reportada, la estabilidad frente a solventes puede ser predicha mediante ensayos computacionales, ya que se ha demostrado la relación entre la estructuras compactas y estabilidad frente a solventes (Shehata, Timucin, Venturini, & Sezerman, 2020).

#### 3.4.2.4 Evaluación de la actividad en presencia de alcoholes

Se evaluó la actividad en las condiciones descritas en 3.3.2 suplementando la mezcla reactiva del ensayo de actividad con diferentes concentraciones de glicerol, etanol y metanol. La finalidad de este ensayo fue determinar si la enzima es capaz de actuar en las condiciones de partida de la reacción de síntesis de biodiesel, en el caso del etanol o metanol, y en las condiciones finales en el caso del glicerol, ya que la concentración de éste aumenta conforme avanza la síntesis de biodiesel. Dado que la síntesis enzimática de biodiesel planteada incluye determinado porcentaje de agua en la mezcla de reacción, el cual proviene de las materias primas utilizadas como se mencionó en el capítulo de introducción, la reacción en cuestión será un equilibrio entre la síntesis y la hidrólisis del biodiesel (Cavalcante et al., 2021). Conocer el rango de concentración de etanol o metanol en el cual la enzima es activa es de utilidad para conocer la máxima concentración de alcohol que puede ser empleada, para favorecer el desplazamiento del equilibrio hacia la formación del producto de interés, sin que la misma afecte la actividad enzimática (Lotti, Pleiss, Valero, & Ferrer, 2015). Como se aprecia en la *Figura 3.8* la adición de los compuestos evaluados en concentración de hasta 5% v/v no afecta la actividad enzimática. Para el caso de etanol la pérdida de actividad es cada vez mayor conforme aumenta la concentración, siendo de aproximadamente un 50 % cuando la concentración de etanol en la mezcla de reacción fue 20 % v/v. Por otro lado, la adición de metanol a la mezcla de reacción tiene un efecto menos nocivo sobre la actividad enzimática, provocando una disminución del 20 % de la actividad cuando su concentración es del 20 % v/v. Por su parte la presencia de 10 % v/v de glicerol en la mezcla de reacción provocó una disminución de la actividad del 10 %, el efecto de este

no se evaluó a concentraciones superiores ya que las mismas no se alcanzan durante el proceso de síntesis de biodiesel. Este efecto era esperable ya que el glicerol puede actuar como inhibidor de la enzima en la reacción de transesterificación como ha sido descrito previamente (Bélafi-Bakó, Kovács, Gubicza, & Hancsók, 2002; Y. Xu, Nordblad, Nielsen, Brask, & Woodley, 2011).

La pérdida de actividad puede deberse principalmente a la desnaturalización irreversible de la enzima causada por la interrupción de interacciones hidrofóbicas intramoleculares o

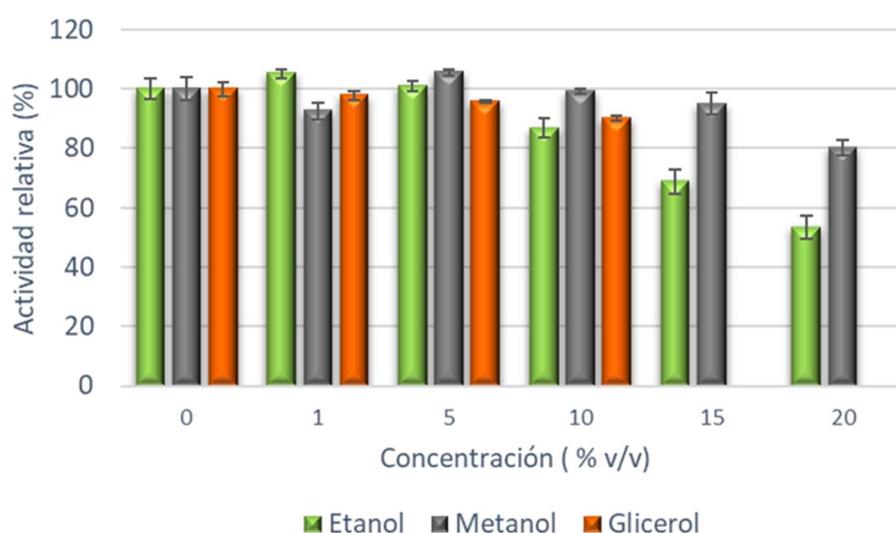


Figura 3.8. Actividad de la lipasa AMANO en presencia de alcoholes. La actividad fue medida en las condiciones descritas en 3.3.3, suplementando la mezcla de reacción con la concentración de alcohol indicada en cada caso. En todos los casos se tomó como 100% la actividad expresada en ausencia de alcoholes.

a que estos alcoholes actúen como inhibidores de la enzima (Lousa, Baptista, & Soares, 2012). Además, no debe perderse de vista que las moléculas en solución se encuentran rodeadas de una capa de moléculas de agua con las que interactúa mediante enlaces de hidrógeno. Esta capa de hidratación es indispensable para mantener la conformación nativa de la proteína. En presencia de solventes orgánicos polares, estas moléculas de agua pueden verse desplazadas causando la pérdida de la estructura nativa, necesaria para que la enzima desarrolle su actividad catalítica. Se ha reportado que esta es una de las principales causas de la desnaturalización de proteínas mediada por solventes orgánicos (Irazoqui, Giacomini, Batista-Viera, & Brena, 2007).

La estabilidad mostrada por la lipasa AMANO frente a la temperatura y frente a hexano, así como la actividad en presencia de alcoholes nos permitieron suponer que esta enzima es adecuada para la aplicación a la síntesis de biodiesel.

#### 3.4.2.5 Evaluación de la síntesis de biodiesel

Con el fin de estudiar el efecto de la temperatura, tiempo de incubación y relación molar etanol:trioleína sobre la reacción de síntesis enzimática de biodiesel utilizando la lipasa AMANO se diseñaron condiciones de reacción en las que se evaluó el efecto de cada variable sobre la cantidad de esteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs) producidos. En todos los casos se utilizó la misma concentración de liofilizado de la lipasa AMANO (5,0 mg/mL, que corresponden aproximadamente 1,5 UE/mL). Cada variable se ensayó en dos niveles, temperatura 40 y 50 °C, tiempo de reacción 48 y 96 horas, y relación molar etanol:trioleína 6:1 y 9:1. Adicionalmente se incluyó un punto central por triplicado (45 °C, 72 horas y relación molar etanol:trioleína 7,5:1). Los ensayos de síntesis de biodiesel en las diferentes condiciones se llevaron a cabo siguiendo lo descrito en 3.3.9. Las reacciones se evaluaron cualitativamente mediante TLC, y mediante cromatografía de gases se cuantificaron los FAEEs producidos, según los procedimientos descritos en 1.3.2.10 y 3.3.16 respectivamente.

En la Tabla 3.2 se muestran los resultados obtenidos en las diferentes condiciones en las que se llevaron a cabo los ensayos de síntesis de biodiesel, expresados como la concentración de FAEEs generados.

Tabla 3.2 Evaluación de las condiciones de síntesis de biodiesel

Ensayo	Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	Relación etanol:trioleína (mol/mol)	FAEEs (µg/mL)
1	40	48	6:1	46,40
2	40	48	9:1	31,89
3	40	96	6:1	58,07
4	40	96	9:1	86,58
5	50	48	6:1	20,67
6	50	48	9:1	38,77
7	50	96	6:1	27,13
8	50	96	9:1	23,96
9	45	72	7,5:1	83,81
10	45	72	7,5:1	43,47
11	45	72	7,5:1	52,99

Los resultados obtenidos fueron comparados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) para cada variable por separado, y a las medias obtenidas se les realizó un test HSD (Honestly-Significant-Difference) utilizando el software Infostat. Diferencias con un  $P < 0,1$  se consideraron significativas. Mediante este análisis la única variable que demostró ser estadísticamente significativa fue la temperatura, obteniéndose mayor cantidad de FAEEs a 40 °C.

Observando en detalle la Tabla 3.2, se aprecia que los ensayos 9, 10 y 11 fueron réplicas entre sí y el resultado obtenido para estos se utilizó para evaluar la reproducibilidad de la obtención de FAEEs. A partir de la cuantificación realizada se puede apreciar que la reproducibilidad de la reacción fue baja, lo que puede explicar por qué no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos. Dicho de otra forma, por ejemplo, el resultado obtenido para el ensayo 2 es estadísticamente igual al obtenido en el ensayo 4, donde la única diferencia entre ellos es el tiempo de reacción. Esta conclusión se enfrenta con los resultados obtenidos previamente en el estudio de estabilidad con la temperatura, cuando se determinó que la enzima no varía su actividad al ser incubada a 40 °C entre 48 y 96 horas (ver 3.4.2.2) y también con los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad en presencia de hexano, donde se observó que la enzima es estable en presencia de hexano durante 96 horas, conservando más del 70 % de su actividad (ver 3.4.2.3). Por lo que podemos afirmar que la enzima es activa en esas condiciones entre las 48 y 96 horas, lo que debería conducir a un aumento de la

concentración de FAEEs producidos en ese lapso, aunque no tenemos evidencia estadística de ello.

Es importante destacar que el análisis de varianzas llevado a cabo indica que las variables evaluadas no tienen influencia significativa en el resultado a los niveles ensayados, pero podrían serlo si se variaran las condiciones. Para confirmar esta hipótesis se debería diseñar y desarrollar un nuevo análisis factorial utilizando otros valores de las variables en cuestión. Una opción sería intentar desplazar el equilibrio de la reacción hacia la formación del producto de interés, mediante el aumento de la relación molar etanol: trioleína. Como se vio en el punto 3.4.2.4, la enzima mantiene más del 80% de su actividad en presencia de etanol 10% v/v, aun así, se debería evaluar la estabilidad de la lipasa a lo largo del tiempo, en presencia de la concentración de alcohol seleccionada. Otra alternativa es la modificación de la temperatura de reacción, el aumento de la misma está limitado por el bajo punto de ebullición del hexano (69 °C) y por la marcada pérdida de actividad de la enzima observada a tiempos cortos (ver 3.4.2.2).

Una temperatura menor a 40 °C podría ser beneficioso para la estabilidad de la enzima, sin embargo, según lo observado en 3.3.4.1. la actividad de esta disminuye mucho por debajo de los 40 °C. Sería necesario evaluar si estos efectos se compensan mutuamente durante el tiempo que dure el proceso.

Otra posibilidad sería extender el tiempo de reacción a 40 °C, ya que se vio que la reacción avanza durante todo el tiempo que se evaluó; para ello se debería analizar la estabilidad de la enzima a esta temperatura durante el nuevo tiempo a ser evaluado. Finalmente, el aumento de la cantidad de enzima en la mezcla de reacción significaría sin duda un aumento de la cantidad de FAEEs producidos en las condiciones ensayadas. Si bien los ensayos realizados no nos permitieron realizar una optimización de las variables para la síntesis de biodiesel, se puede considerar que, de las condiciones ensayadas las correspondientes al experimento 4 y 9 aportaron los mejores rendimientos de reacción.

En la *Figura 3.9* se muestra el resultado del análisis por TLC de los mismos experimentos detallados en la *Tabla 3.2*. En todos los carriles se sembró igual cantidad de muestras (5 µL). Los carriles A, B y C correspondientes a los blancos de reacción a las diferentes

temperaturas (40, 45 y 50 °C respectivamente) luego de 96 horas de reacción, indican que no hay síntesis de biodiesel en dichas condiciones en ausencia de enzima.

La comparación visual de la intensidad de las manchas correspondiente a los FAEEs en cada caso permite visualizar el grado de avance de la reacción, teniendo en consideración que se sembró la misma cantidad de muestra en cada carril. Las condiciones 5, 7 y 8 mostraron muy bajo nivel de conversión, en forma concordante al análisis realizado por GC. Las tres condiciones corresponden a la síntesis desarrollada a 50 °C, lo que es concordante con los resultados observados en los ensayos de estabilidad a esta temperatura donde se observaba una gran pérdida de la actividad a tiempos

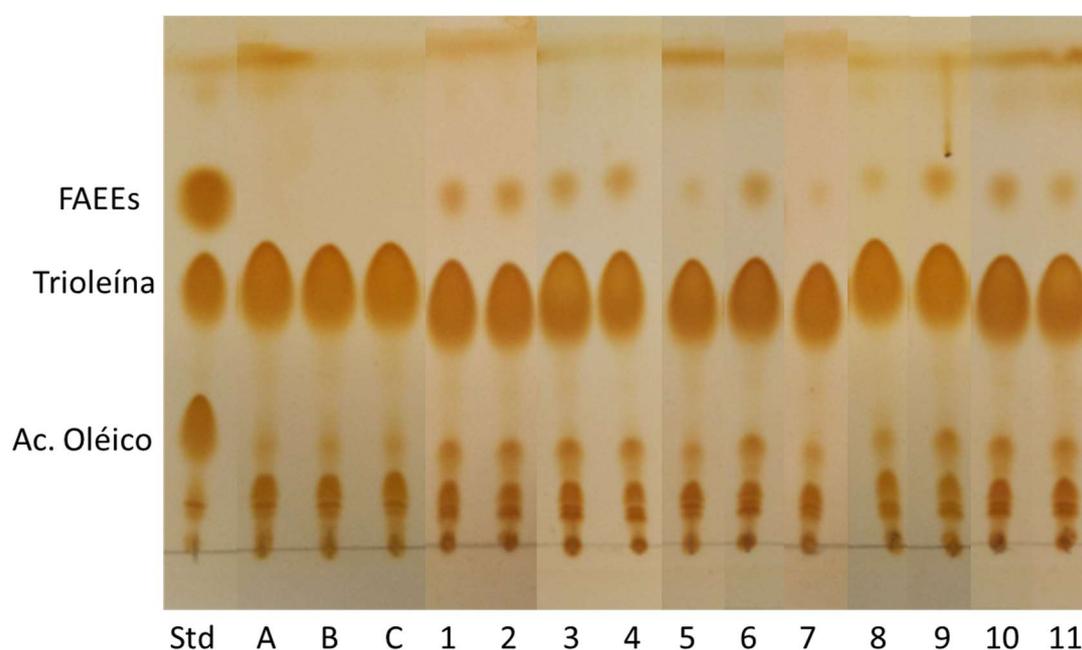


Figura 3.9. TLC de las condiciones correspondientes al diseño factorial de la Tabla 3.2, revelada en cámara de yodo. Std, corresponde al control de resolución. Carriles A, B y C corresponden al blanco de reacción (sin enzima) a 40, 45 y 50 °C respectivamente a las 96 hs de reacción, carriles 1 a 11 corresponden a las condiciones 1 a 11 del ensayo factorial respectivamente.

cortos de incubación (35% de actividad remanente luego de 96 horas de incubación).

Entre las condiciones que mostraron manchas de FAEEs más intensas se encuentran la 9, 10 y 11 las cuales corresponden a la misma condición evaluada por triplicado (45 °C, 72 horas, relación molar etanol: trioleína 7,5:1); si bien mediante TLC parecen tener un comportamiento similar, cuando fueron evaluadas mediante cromatografía gaseosa la condición 9 dio un resultado sorprendentemente alto en comparación con sus réplicas

(condiciones 10 y 11), por lo que se desestimó dicha replica. Las condiciones 1 a 4 correspondientes a las reacciones desarrolladas a 40 °C, a los dos niveles estudiados de tiempo y relación etanol: trioleína, mostraron muy buen desempeño. Observando la cuantificación por cromatografía gaseosa de estas muestras (Tabla 3.2) y comparando el tiempo de reacción entre las 4 condiciones mencionadas, se aprecia que a mayor tiempo de reacción (96 horas vs 48 horas), mayor es la cantidad de FAEEs producidos, para la misma relación etanol: trioleína. Si se hace lo mismo para la relación etanol: trioleína (6:1 y 9:1), se observa que la cantidad de FAEEs producida es mayor con la relación 9:1, para ambos tiempos de reacción.

Luego del análisis realizado, se decidió seleccionar 40 °C, 96 horas y relación etanol: trioleína 9:1 como las condiciones de referencia para las reacciones de síntesis de biodiesel utilizando la lipasa Amano.

#### 3.4.2.6 Evaluación de la estabilidad de lipasa AMANO frente al pH

Las diferentes estrategias de inmovilización para la lipasa AMANO fueron diseñadas de manera de inmovilizar la enzima a través de diferentes químicas de unión entre la misma y el soporte. Cada una de ellas involucran etapas de incubación a diferentes pH y durante diferentes tiempos, por lo que resultó necesario evaluar la estabilidad de la enzima a esos pH.

En primera instancia se llevó a cabo un screening de la estabilidad a pH 5,0, 8,0 y 10,0 durante 24 horas a 4 °C donde se constató que la enzima retuvo más del 90 % de la actividad inicial a pH 5,0 y 8,0, mientras que a pH 10 la actividad remanente fue del 58 %.

También se estudió la cinética de inactivación de la enzima a pH 10 a tiempos cortos (120 minutos) realizado a 4 °C y a temperatura ambiente. A las 2 hs de incubación a pH 10 la enzima conserva aproximadamente el 90 % y el 75% de su actividad, a 4 °C y a temperatura ambiente, respectivamente (*Figura 3.10*).

Dado que la estabilidad demostrada por la enzima frente a su incubación a pH 5,0 y 8,0, fue muy buena, es posible aplicarla a procesos inmovilización que requieran incubación a dichos pHs. Por el contrario se descartó el uso del soporte activado con grupos glioxil,

ya que son necesarios tiempos de incubación largos a pH 10 de acuerdo en a lo reportado en la literatura (Bickerstaff, 1997)

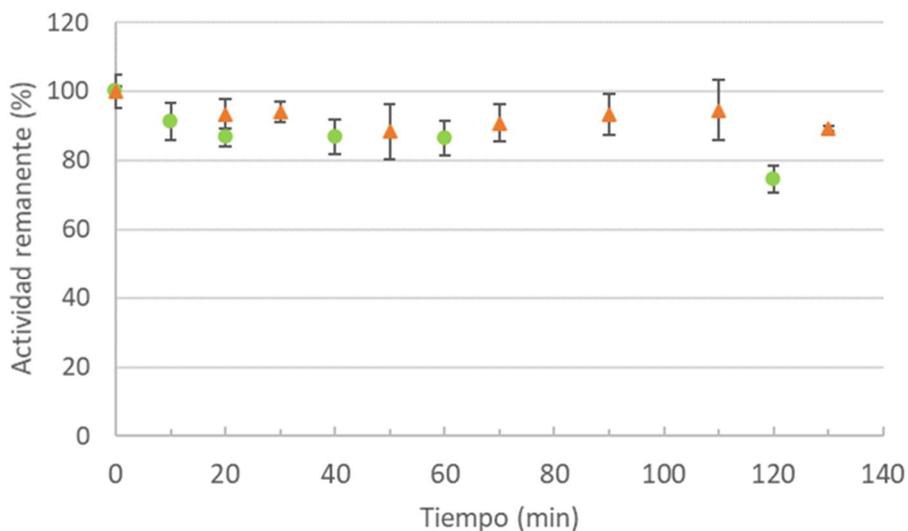


Figura 3.10. Ensayo de estabilidad de la lipasa AMANO a pH 10. La incubación de la enzima fue realizada a 4 °C (triángulo naranja) y a temperatura ambiente (círculo verde). Se muestra la actividad remanente medida a diferentes tiempos, en las condiciones descritas en 3.3.3.

### 3.4.3. Desarrollo de derivados inmovilizados de la lipasa AMANO

Para el desarrollo de derivados inmovilizados de la lipasa AMANO purificada se plantearon tres estrategias diferentes que involucraron la formación de enlaces covalentes estables entre diferentes grupos reactivos presentes en la superficie de la enzima y los introducidos en el soporte utilizado: i) inmovilización sobre agarosa activada con agentes cianilantes (3.3.14) a través de los grupos amino de las cadenas laterales de los residuos de lisina, mediante formación de un enlace isourea (derivado AMANO-CDAP) (Figura 3.1); ii) inmovilización en MANA-agarosa (3.3.12.1) por reacción de los grupos amino del soporte y los grupos carboxilato de los residuos de aspártico y glutámico, formando un enlace amida (derivado AMANO-carboxilos); iii) formación de una base de Schiff mediante la reacción de grupos aldehído generados mediante la oxidación de los azúcares presentes en la superficie de la enzima (3.3.12.2) y los grupos aminos del soporte MANA-agarosa, y la posterior reducción a un enlace alquilamino (derivado AMANO-azúcares) (Figura 3.3).

Tabla 3.3. Evaluación de los procesos de inmovilización de la lipasa AMANO

SopORTE/grupo reactivo de la proteína	Tipo de enlace	UE ofrecidas/ g gel SD	UE inmovilizadas /g gel SD	UE expresadas/ g gel SD	AI (%)	AE (%)
Agarosa ciano activada/amino	isourea	5,7	5,6	3,9	98	69
MANA-agarosa/carboxilo	amida	7,5	6,8	4,7	91	69
MANA-agarosa/aldehído	alquil-amino	3,6	3,6	1,1	99	31

SD: suction dried.

UE inmovilizadas/ g gel SD = (UE ofrecidas-UE sobrenadante de inmovilización)/g gel SD; AI (%) porcentaje de actividad inmovilizada= (UE inmovilizadas/UE ofrecidas)\*100 (por g de gel SD); AE (%) porcentaje de actividad expresada= (UE expresadas/UE inmovilizadas)\*100 (por g gel SD).

Los datos calculados expresan los resultados obtenidos para tres repeticiones del ensayo de inmovilización, en todos los casos el error observado se encontró por debajo del 10 % del valor informado.

Como se puede apreciar en la Tabla 3.3, para el derivado AMANO-CDAP (inmovilización en agarosa cianoactivada), se obtuvo un porcentaje de actividad inmovilizada muy alto, sin embargo, el porcentaje de actividad expresada fue del 69 %, indicando que no toda la proteína inmovilizada se encuentra activa. Las causas de esta pérdida de actividad durante el proceso de inmovilización pueden ser varias, pero podemos descartar un efecto negativo por las condiciones de pH y temperatura ya que se mantuvo un control de enzima soluble en las mismas condiciones en las que se realizó la inmovilización. Además, se debe recordar que una de las ventajas de esta estrategia de inmovilización precisamente es que se lleva a cabo en condiciones de pH y temperatura muy benignas (pH 8,0 y temperatura ambiente durante 4 horas).

A pesar de no conocer la estructura de esta enzima es esperable que presente lisinas expuestas en su superficie, ya que éste es un aminoácido abundante en las proteínas y por su carácter hidrofílico se encuentra generalmente expuesto hacia la solución acuosa formando enlaces de hidrógeno con el agua. En este caso particular la cantidad de aminoácidos básicos parece ser menor que la de aminoácidos ácidos ya que el punto isoeléctrico de la enzima es menor a 7 como se demostró en el intercambio iónico desarrollado durante la purificación. La presencia de múltiples residuos de lisina, posibilitaría la interacción multipuntual de la enzima con el soporte, y esto podría estar conduciendo a una rigidificación excesiva de la estructura, que se traduce en un exceso de tensión en la región del sitio activo disminuyendo la afinidad por el sustrato (Grazú et al., 2010; Mateo et al., 2006; Ryan & Ó'Fágáin, 2007). Otro factor que afecta la pérdida

de actividad expresada es la orientación de la enzima una vez inmovilizada. Ya que las lisinas que participan en la inmovilización se encuentran distribuidas en la superficie de la enzima, no es posible llevar a cabo una inmovilización orientada. Entonces existirán casos donde la orientación del sitio activo dificulte el acceso del sustrato, disminuyendo la actividad expresada.

Durante el desarrollo del derivado AMANO-carboxilos (inmovilización sobre MANA-agarosa a través de los grupos carboxilo), se obtuvo un elevado porcentaje de actividad inmovilizada (91%), mientras que el porcentaje de actividad expresada fue menor (69%). Esta estrategia también fue llevada a cabo bajo condiciones de pH y temperatura donde la enzima había demostrado ser estable, lo que fue confirmado por el control de inmovilización con la enzima soluble. Nuevamente el comportamiento observado puede deberse a la rigidificación sufrida por la inmovilización multipuntual de la enzima, ya que los grupos carboxilo de los residuos aspártico y glutámico también suelen ser abundantes en las proteínas, en particular esta enzima cuyo punto isoeléctrico es bajo por lo que es de esperar una alta proporción de este tipo de aminoácidos. A diferencia del soporte ciano-agarosa, el soporte MANA-agarosa presenta un brazo espaciador entre la matriz y el grupo funcional introducido que contiene 5 átomos más (*Figura 3.2*); mediante esta estrategia se buscó minimizar los problemas difusionales del sustrato hacia el sitio activo (Bickerstaff, 1997). Si bien la incorporación del brazo espaciador aporta movilidad a la enzima inmovilizada permitiendo mayor acceso del sustrato al sitio activo, si el número de interacciones entre la enzima y el soporte fuese demasiado elevado igualmente podría verse impedido el acceso del sustrato al sitio activo (Guisán et al., 2003).

Por último, el desarrollo del derivado AMANO-azúcares (inmovilización sobre MANA-agarosa a través de grupos aldehído generado por oxidación de los azúcares presentes en la superficie de la enzima), mostró un elevado porcentaje de actividad inmovilizada (99%) mostrando que la oxidación de los azúcares para generar grupos aldehído en la superficie de la proteína es una estrategia válida y eficiente, como alternativa para la inmovilización de proteínas sobre MANA-agarosa. Esta estrategia puede ser muy útil para proteínas que carezcan de grupos carboxilo o no los tenga expuestos en su superficie, la gran limitación es que la proteína en cuestión debe ser glicosilada. Al tratarse de una enzima extracelular de *A. niger* la lipasa AMANO es una candidata a estar

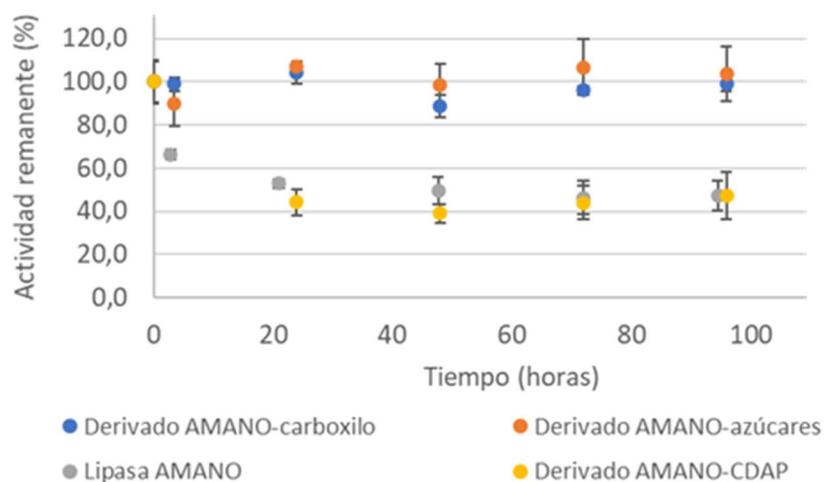
glicosilada y por ende a que se aplique esta estrategia para su inmovilización (Deshpande, Wilkins, Packer, & Nevalainen, 2008; L. Wang et al., 2012).

Pese al éxito obtenido en la etapa de inmovilización, la actividad expresada por el derivado fue la más baja de las observadas, 31 %. La baja actividad expresada por el derivado responde en parte a que la inmovilización se da en una primera etapa a través de la formación de un enlace tipo base de Schiff, el cual es lábil y no garantiza la unión irreversible de la enzima (Bickerstaff, 1997). Es necesario la incorporación de un paso final de reducción de la base de Schiff para la formación del enlace alquil-amino muy estable. Este paso se lleva a cabo por adición de 1,0 mg/mL de NaBH<sub>4</sub> en buffer carbonato de sodio 50 mM, pH 10 con un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. Se midió la actividad expresada del derivado AMANO-azúcares sin reducir y se comparó con el derivado reducido, y se observó que la etapa de reducción genera una pérdida de actividad expresada de entre 15 y 20 %. El control de inmovilización realizado con la enzima soluble en las mismas condiciones (1 mg/mL de NaBH<sub>4</sub> en buffer carbonato de sodio 50 mM, pH 10 con un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente), mostró una pérdida de actividad aún mayor, aproximadamente del 40 % para la enzima en solución. Esta pérdida de actividad podría deberse al pH elevado (pH 10) o a la acción reductora del NaBH<sub>4</sub> sobre la proteína. La *Figura 3.10* muestra que a los 30 minutos la enzima soluble tiene una leve pérdida de actividad a pH 10 y temperatura ambiente (aproximadamente 10 %), pero que no explicaría el 40% de pérdida de actividad observada para el control. Evidentemente la presencia del NaBH<sub>4</sub> es perjudicial para la estructura de la proteína, hecho que se traslada a la actividad de la misma. (Blanco & Guisán, 1989; Orrego et al., 2018).

De esta forma se obtuvieron tres derivados inmovilizados de la lipasa AMANO, de los cuales tanto el derivado AMANO-CDAP como el AMANO-carboxilo mostraron la misma eficiencia de inmovilización, ya que ambos derivados expresaron el 69% de la actividad inmovilizada, indicando que las dos estrategias de inmovilización resultaron ser muy buenas. El derivado AMANO-aldehído mostró una eficiencia de inmovilización bastante menor en comparación con los dos anteriores (31%), debido en gran medida por la pérdida de actividad expresada durante la etapa de reducción.

### 3.4.3.1 Estudio de la estabilidad de los derivados inmovilizados frente a la temperatura

Con el objetivo final de utilizar estos derivados en las condiciones seleccionadas en la sección 3.4.2.5 para llevar a cabo la síntesis de biodiesel, se estudió la estabilidad a 40 °C a tiempos largos de los tres derivados inmovilizados obtenidos. En la *Figura 3.11* se



*Figura 3.11. Estabilidad de los derivados inmovilizados y la enzima en solución, frente a la temperatura (40 °C)*

muestra el desempeño de los diferentes derivados inmovilizados y su comparación respecto a enzima en solución. En todos los casos se incubó la misma cantidad de UE de enzima soluble o el derivado inmovilizado, con el fin de que los resultados obtenidos puedan ser comparados. Como se puede apreciar el derivado AMANO-CDAP, sufre una gran pérdida de actividad durante las primeras 24 horas de incubación, para luego permanecer estable con un porcentaje de actividad remanente de aproximadamente 50 %, hasta el final del tiempo ensayado. Este comportamiento es muy parecido al mostrado por la enzima en solución a la misma temperatura, por lo que en este caso la estrategia de inmovilización no significó un aumento en la estabilidad térmica de la enzima. Mientras que los otros dos derivados inmovilizados desarrollados en base a MANA-agarosa mostraron gran estabilidad conservando aproximadamente el 100 % de su actividad luego de 96 horas de incubación a 40 °C en comparación con el 50 % de la actividad remanente de la enzima en solución en las mismas condiciones. Es importante destacar la gran estabilización lograda mediante la inmovilización en MANA-agarosa.

Esto los convierte en excelentes candidatos para conducir la síntesis de biodiesel en esta condición.

La diferencia observada entre el derivado AMANO-CDAP y los derivados AMANO-carboxilo y AMANO-azúcares puede residir en el número de uniones logradas entre la enzima y el soporte. Como ya fue mencionado no conocemos la estructura de la enzima en cuestión, pero en caso de tener una cantidad reducida de lisinas expuestas, el número de enlaces establecidos en el derivado AMANO-CDAP sería menor que en los otros derivados, lo que rigidificaría menos la estructura y estabilizaría menos a la enzima (Grazú et al., 2010; Guisan et al., 2020).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los tres derivados inmovilizados se selecciona el derivado AMANO-carboxilo por mostrar el mejor balance entre actividad expresada y estabilidad a 40 °C, para continuar los objetivos del capítulo.

### **3.5. Conclusiones del capítulo**

Al iniciar el trabajo con preparado comercial AMANO A12 fue evidente desde un principio a través del análisis mediante PAGE-SDS que el mismo representaba un extracto contenido múltiples bandas proteicas. Por lo tanto, si bien no estaba previsto originalmente dentro del plan de trabajo fue necesario establecer un protocolo de purificación de una enzima con actividad lipasa. En ese sentido se logró desarrollar un procedimiento para la purificación de una enzima con actividad lipasa a partir del preparado comercial AMANO A12. La misma demostró tener su máximo de actividad a temperaturas moderadamente elevadas (50 °C). El comportamiento de la enzima al ser incubada a 40 °C a tiempos cortos mostró una rápida inactivación, pero que sin embargo a tiempo suficientemente largos (96 horas) la enzima mantiene un estado parcialmente activo con un porcentaje de actividad remanente de aproximadamente 50 % que hace posible su aplicación en reacciones que requieran incubaciones largas. La enzima mostró gran estabilidad frente a su incubación a pH 5,0 y 8,0 durante 24 horas, y en menor grado a pH 10,0.

Se evaluó la capacidad de la enzima para conducir la síntesis de biodiesel para lo cual se estudió la actividad en presencia de los diferentes componentes de la mezcla reactiva, donde se constató que la lipasa AMANO no ve afectada su actividad en presencia de

etanol, metanol hasta 10 % v/v. También demostró conservar la actividad en presencia de hasta 10 % v/v de glicerol, producto de la reacción de biodiesel que como ya se mencionó puede ser perjudicial para la enzima. La enzima mostró ser estable al ser incubada en hexano durante 96 horas a temperatura ambiente, conservando más del 70 % de su actividad inicial. Se llevaron a cabo reacciones de síntesis de biodiesel, en diferentes condiciones de manera de seleccionar aquellas que favorece la mayor producción de FAEEs (40 °C, 96 horas de reacción y una relación molar etanol:trioleína 9:1).

Con el fin de desarrollar derivados inmovilizados de la lipasa AMANO purificada se evaluaron diferentes estrategias de unión de la enzima a soportes, involucrando diferentes grupos reactivos presentes en la superficie de la enzima y diferentes químicas de unión, todas ellas garantizando la interacción covalente irreversible entre la proteína y el soporte. Mediante las tres estrategias de inmovilización llevadas a cabo se lograron derivados activos con eficiencias de inmovilización entre 69 y 31%. Los derivados inmovilizados desarrollados en base a la interacción de soporte cianato éster activado y los grupos amino de las lisinas de la enzima, así como entre los grupos amino del MANA-agarosa y los grupos carboxilo de la enzima, fueron los que mostraron mejores rendimientos en cuanto a la actividad expresada (69), lo que permite considerar a ambas estrategias de inmovilización muy eficientes.

Se evaluó también la estabilización de la enzima inmovilizada frente a la temperatura, 40 °C a 96 hs de incubación, donde se observó que los dos soportes basados en MANA-agarosa son capaces de generar un gran aumento en la estabilidad respecto a lo observado para la enzima en solución. Basados en los resultados obtenidos se seleccionó el derivado AMANO-carboxilo para continuar los objetivos del capítulo.

La incertidumbre generada por la situación sanitaria nos llevó a detener en este punto el trabajo, y concluir el posgrado. Dejando pendiente la caracterización bioquímica de los derivados inmovilizados desarrollados y su aplicación a la síntesis de biodiesel.

# Capítulo 4

---



## **Capítulo 4. Inmovilización de la lipasa BTL 2 sobre nanopartículas magnéticas para su aplicación a ensayos de hipertermia magnética**

### **4.1. Introducción**

La nano-biocatálisis es una sub área de la biocatálisis, surge de la sinergia entre la nanotecnología y la tecnología de materiales y provee a la biocatálisis de materiales nanoestructurados con propiedades muy interesantes para ser aplicados como soportes para la inmovilización de enzimas (Johnson, Park, & Driscoll, 2011; J. Kim, Grate, & Wang, 2008, 2006).

La utilización de soportes nanoestructurados para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados trae consigo todas las ventajas descritas en el capítulo anterior sobre la inmovilización de enzimas. Adicionalmente los nanosportes tienen una gran área superficial o también se puede ver como gran relación volumen/radio, lo que permite inmovilizar mayor cantidad de proteína por partícula de soporte (P. Wang, 2006). Las enzimas inmovilizadas sobre nanopartículas se comportan como una partícula estable, monodispersa en suspensión acuosa, exhibiendo movimiento Browniano. Por lo que su movilidad y difusión en la solución se encuentra entre medio de las enzimas libres y los catalizadores heterogéneos, minimizando los problemas de transferencia de masa en comparación con los soportes macro utilizados convencionalmente (M. N. Gupta, Kaloti, Kapoor, & Solanki, 2011; Jia et al., 2002; J. Kim, Jia, & Wang, 2006; P. Wang, 2006). Sin embargo, los nanosportes también tiene algunos puntos negativos, el elevado costo de producción limita su aplicación a gran escala y su remoción del medio de reacción es dificultosa (excepto nanosportes con propiedades magnéticas) (Dong, Li, Li, Hu, & Luo, 2012).

Existe una gran diversidad de nanosportes, de diversos materiales, que pueden ser utilizados para la inmovilización de enzimas, algunos de ellos son: nanopartículas (óxido de hierro, magnetita poliestireno, sílica, zirconio, quitosano), nanofibras (poliestireno, polivinil alcoholes, celulosa, polisulfona, seda), nanotubos (carbono), nanoporos (material móvil cristalino 41, Santa Barbara amorfo 15), nano hojas (óxido de grafeno),

nanocompositos (nanopartículas recubiertas con sílica u oro, óxido de silicio y titanio, nanopartículas magnéticas cubiertas con quitosano o celulosa); cada tipo de partícula/material proporcionará características que deben ser seleccionadas en función del tipo de aplicación que se busque para el derivado inmovilizado (Chronopoulou, Sayalero, Rahimi, Ruggetti, & Palocci, 2021; Eyvazzadeh et al., 2017; Gao, Wang, Diao, Luo, & Dai, 2010; Kaboudin, Khanmohammadi, & Kazemi, 2017; Matsuura et al., 2011; Nikolić, Srđić, & Antov, 2009; Ovejero et al., 2021; Pavlidis et al., 2012; Serra, Mayoral, Sakamoto, Blanco, & Díaz, 2008; Song, Shin, Lee, Park, & Kim, 2012; Van Rie & Thielemans, 2017; C. Zhang et al., 2018)

La remoción del nanosoporte del medio de reacción, como ya se dijo, es una de las principales desventajas de su utilización para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados, pero la misma puede ser solventada mediante la utilización de nanopartículas con propiedades magnéticas (ferromagnéticas) o superparamagnéticas. Su utilización permite la remoción del medio de reacción de forma simple y barata mediante la aplicación de un campo magnético con un imán. Mientras que los compuestos con propiedades magnéticas tienen sus momentos magnéticos ordenados y orientados de forma permanente, los compuestos superparamagnéticos no. Mediante la aplicación de un campo magnético externo es posible lograr que los momentos magnéticos se alineen y adquieran propiedades magnéticas, y se desordenen nuevamente cuando el campo magnético es removido. Dicho de otra forma, los compuestos con propiedades superparamagnéticas se comportan como un imán cuando son expuestos a un campo magnético (*Figura 4.1*) (Gubbala, Nathani, Koizol, & Misra, 2004; Misra, Gubbala, Kale, & Egelhoff, 2004; Mody, Singh, & Wesley, 2013).

La transición que sufre un material superparamagnético de su estado ordenado (presencia de campo magnético) a desordenado, conlleva una pérdida de energía, la cual se disipa en forma de calor en la superficie de la nanopartícula, sin afectar al medio que lo rodea. La cantidad de calor liberado dependerá de varios factores como ser el

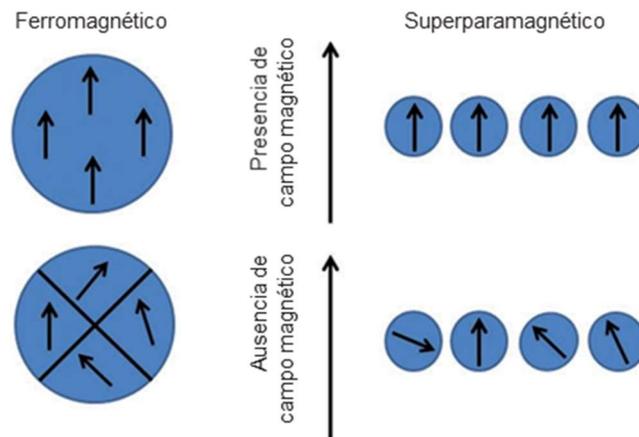


Figura 4.1. Efecto de la aplicación de un campo magnético sobre materiales ferromagnéticos y superparamagnéticos.

material, tamaño, geometría y estado de agregación de la nanopartícula, así como también de la magnitud y frecuencia del campo magnético aplicado. Por lo que controlando estos parámetros es posible controlar el calor generado por las nanopartículas (Gubin, 2009; Mody et al., 2013; Ovejero et al., 2021).

Los soportes de inmovilización con propiedades superparamagnéticas (nanopartículas de óxido de hierro (III)) abren la posibilidad de calentar enzimas unidas a ellos sin afectar el medio de reacción, lo cual es sumamente útil cuando los componentes de este son termolábiles. Una de las estrategias más utilizadas es el calentamiento de las nanopartículas a distancia mediante la aplicación de campos magnéticos pulsátiles, lo que se conoce como hipertermia magnética (Pérido et al., 2015).

La hipertermia magnética ha mostrado ser de gran utilidad para tratamiento de algunos tipos de tumores *in-vivo* (Mody et al., 2013; W. Wu, Wu, Yu, Jiang, & Kim, 2015). Otra aplicación que se encuentra en pleno desarrollo es la inmovilización de enzimas termofílicas o hipertermofílicas sobre nanopartículas superparamagnéticas, y su aplicación en medios de reacción que no pueden ser expuestos a temperaturas elevadas. Sin embargo mediante la estrategia de campos magnéticos pulsátiles antes

explicada, es posible aumentar la actividad catalítica de las enzimas mediante el aumento local de la temperatura sin alterar la temperatura del medio de reacción (Skumiel, Kaczmarek-Klinowska, Timko, Molcan, & Rajnak, 2013; Suzuki et al., 2015)

Además de las características de la nanopartícula y del campo magnético, la orientación de la enzima, respecto a la nanopartícula una vez inmovilizada, así como la distancia entre ellas, son factores determinantes para lograr un calentamiento óptimo que conduzca a un aumento de la actividad enzimática. Para evaluar este efecto se trabajó con cuatro variantes de la lipasa de *Geobacillus thermocatenulatus* (BTL 2) las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Fernando López Gallego. Se seleccionó esta enzima ya que es termofílica y porque ya se ha explorado su inmovilización orientada, sobre soportes clásicos (Godoy et al., 2011).

La secuencia de esta enzima fue modificada de forma que cada una de las variantes presente un grupo particular que asegure su inmovilización a través de él (ver Tabla 4.1). La variante 25 de BTL 2 presenta un dominio de lectina del hongo *Laetiporus sulphureus*, el cual permite inmovilizar la enzima a través de este gracias a su afinidad por azúcares. La variante 26 de la enzima BTL no presenta cisteínas en su estructura, mientras que las variantes 27 y 28 presentan una sola cisteína expuesta en regiones específicas, lo que permite llevar a cabo la inmovilización sitio-dirigida de la enzima y conocer la orientación espacial respecto al soporte utilizado (Godoy et al., 2011).

Tabla 4.1. Mutantes de BTL 2

Variante	Mutación	Modificación estructural
25	Dominio de lectina	Expresión como proteína de fusión, incorporando un dominio de lectina
26	-	Sin cisteínas
27	S333C	Una sola cisteína (C333) ubicada en la región opuesta al sitio activo
28	T93C	Una sola cisteína (C93) ubicada en la cara interna del dominio Lid

Para el desarrollo de los derivados inmovilizados se utilizaron nanopartículas de óxido de hierro, que tienen propiedades superparamagnéticas, las cuales fueron modificadas, y se introdujeron grupos funcionales que permitieron la inmovilización de las diferentes variantes según las características que estas presentan. Para la inmovilización de la

variante 25 se funcionalizaron las NP con galactosa. Mientras que la inmovilización de las variantes 26, 27 y 28 se llevó a cabo en nanopartículas funcionalizadas con sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) (ciclohexano-1-carboxilato) (sulfo-SMCC).

El trabajo que se presenta a continuación se enmarcó en una estancia corta de investigación realizada en 2018 en el Instituto de Materiales de Aragón, España, bajo la supervisión de la Dra. Valeria Grazú. El objetivo de dicha estancia fue capacitarme en la técnica de nanocalentamiento de derivados desarrollados en base a nanopartículas con propiedades superparamagnéticas, inducido por campos magnéticos pulsátiles. Y evaluar la aplicabilidad de esta técnica a la lipasa de *Janibacter sp.* antes purificada, con el fin de sacar máximo provecho de sus destacables propiedades térmicas. Asimismo, el trabajo de caracterización de BTL2 fue realizado en conjunto con la Lic. María Eugenia Cedrés, como parte de su tesis de Licenciatura en Bioquímica la cual realizó bajo mi tutoría y la de la Dra. Irazoqui

## 4.2. Objetivos del capítulo

### 4.2.1. Objetivo general

Desarrollar derivados inmovilizados de la lipasa BTL 2 sobre nanopartículas de óxido de hierro, para su aplicación a ensayos de hipertermia magnética

### 4.2.2. Objetivos específicos

- Producir y purificar las variantes de BTL 2.
- Caracterizar bioquímicamente la enzima purificada.
- Inmovilizar las variantes de la lipasa BTL 2 sobre nanopartículas de óxido de hierro funcionalizadas.
- Aplicar los derivados desarrollados a ensayos de hipertermia magnética.

## 4.3. Materiales y métodos

### 4.3.1. Definición de unidad de enzima para la lipasa 2 de *Geobacillus thermocatenulatus* (BTL2)

Cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de pNP por minuto a pH 7,0 y temperatura ambiente.

### 4.3.2. Ensayos de actividad frente a pNP butirato

Los ensayos de actividad se llevaron a cabo a temperatura ambiente, se realizaron triplicados de cada medida. La mezcla reactiva utilizada se compuso de 2,0 mL de 0,5 mM pNP butirato en buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0, y 50  $\mu\text{L}$  de la dilución de enzima a evaluar; se midió la velocidad de liberación de pNP espectrofotométricamente a 348 nm usando celdas de 1cm de camino óptico. El coeficiente de absortividad para el pNP a 348 nm es  $5,6 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 4.3.3. Determinación de la concentración de proteína

La determinación de la concentración de proteína se llevó a cabo mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) utilizando el kit comercial Pierce™ BCA Protein Assay Kit, en las condiciones descritas por el proveedor, (ThermoScientific, n.d.)

#### 4.3.4. Producción de la lipasa BTL 2 de *Geobacillus thermocatenulatus*

Se inocularon 5 mL de medio LB ampicilina (precultivo) con una colonia fresca de las cepas de *E. coli* conteniendo las construcciones necesarias para la expresión de las variantes de BTL2 (cepas AC XXV, AC XXVI y AC XXVII), las cuales fue desarrolladas y cedidas a nosotros por el Dr. Fernando López Gallego del Centro de Investigación Cooperativa en Biomateriales de San Sebastián, España. Los precultivos se incubaron a 37 °C y 200 rpm ON. Con 1 mL de precultivo, se inocularon 100 mL de medio LB ampicilina y se incubaron a 37 °C y 200 rpm hasta  $OD_{600} = 0,5$ . Se indujo la expresión de proteína mediante el aumento de la temperatura a 42 °C, con agitación constante a 200 rpm durante 15 horas. Posteriormente se centrifugaron los cultivos a 4 °C y 8000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante.

La producción de la proteína de fusión LSLt-BTL2 (cepa AC XVIII) (variante 25 de BTL 2) se llevó a cabo en las condiciones descritas por (López-Gallego et al., 2012).

#### 4.3.5. Purificación de la lipasa BTL 2 de *Geobacillus thermocatenulatus*

Se resuspendió el pellet de células correspondiente a 50 mL de cultivo, en 4,0 mL de buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0, y se suplementó con lisozima a una concentración de 30 µg/mL, se incubó durante 30 minutos en baño de hielo. Se sonicó 5 veces durante 1 minuto a 20% de amplitud, con pausas de dos minutos entre medio, todo el tiempo la muestra se mantuvo en baño de hielo. Posteriormente el lisado se centrifugó a 10000 rpm y 4 °C durante 15 minutos y se conservó la fracción soluble (sobrenadante) conteniendo la enzima de interés. Se incubó en batch 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 rototorque durante 90 minutos, a 4 °C. Posteriormente se descartó el percolado y se lavó la octil-agarosa 2 veces con 4,0 mL cada vez, de buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0, durante 5 minutos a 4 °C, con agitación moderada en rototorque, descartando el lavado cada vez. Se eluyó la proteína adsorbida mediante el agregado de 2,0 mL de buffer fosfato de sodio 25 mM suplementado con Tritón X-100 2% v/v pH 7,0, incubando durante 90 minutos en rototorque a temperatura ambiente. El eluido obtenido en el paso anterior se incubó con 1,0 g de dietilaminoetil-agarosa (DEAE-agarosa) secada por filtración al vacío equilibrada en buffer fosfato de sodio 25

mM, pH 7,0, con agitación suave en rotatorque durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se recuperó el percolado donde se encuentra la proteína de interés y se dializó tres veces contra buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0, durante 2 horas cada vez, a 4 °C. La muestra dializada se almacenó a 4 °C hasta su utilización.

#### 4.3.6. Estudio del efecto del Tritón X-100 sobre la actividad enzimática

Para estudiar el efecto del Tritón X-100 en la actividad enzimática se siguió el procedimiento descrito en la sección 4.3.2, suplementando la mezcla de reacción con Tritón X-100 en concentraciones entre 0,01 y 1% v/v.

#### 4.3.7. Estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

El estudio del efecto de la temperatura se llevó a cabo en un espectrofotómetro Shimadzu 1800 UV-Vis el cual está provisto de una camisa de agua conectada a un baño termostático que permite controlar la temperatura en la celda de reacción. Para determinar la actividad enzimática se siguió el procedimiento descrito en la sección 4.3.2 modificando la temperatura de reacción en cada caso.

#### 4.3.8. Estudio del efecto del pH sobre la actividad enzimática

Para estudiar el efecto del pH en la actividad enzimática se siguió el procedimiento descrito en la sección 4.3.2 sustituyendo el buffer fosfato por buffer tris-bórico-acético (ATB) 50 mM a diferentes pH.

#### 4.3.9. Estudio del efecto del efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática

Para estudiar el efecto de los iones metálicos sobre la actividad enzimática se siguió el procedimiento descrito en la sección 4.3.2, suplementando la mezcla de reacción con sales de los metales a evaluar (NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CoSO<sub>4</sub>, NiSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>) a concentraciones de 1, 10 o 20 mM en la mezcla de reacción.

#### 4.3.10. Evaluación de la estabilidad frente a la temperatura

Se incubaron 70 UE/mL de la variante 27 de BTL 2 en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0 durante una hora a cada temperatura evaluada, pasado ese tiempo se procedió a cuantificar la actividad remanente en las condiciones descritas en 4.3.2.

#### 4.3.11. Evaluación de la estabilidad frente al pH

Se incubaron 140 UE/mL de la variante 27 de BTL 2 en buffer ATB 50 mM a diferentes pH durante 24 horas a temperatura ambiente. Luego de la incubación se realizó el ensayo de actividad en las condiciones establecidas en 4.3.2.

#### 4.3.12. Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro (NPs)

Se disolvieron 8,89 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  y 3,28 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  en 380 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  con agitación magnética constante, se agregaron lentamente 1,5 mL de HCl 37% hasta disolución completa de las sales. Se adicionaron lentamente bajo agitación vigorosa 25,0 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  25%. Luego de la formación de precipitado de color negro, se continuó agitando durante 10 minutos. Se detuvo la agitación y se precipitaron las partículas con ayuda de un magneto de NdFeB (imán de neodimio). Se retiró el sobrenadante y se lavaron dos veces las nanopartículas (NPs) con 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ durante 10 minutos con agitación magnética cada vez. Luego del último lavado se agregaron 40 mL de  $\text{HNO}_3$  2,0 M y se calentó a 90 °C durante 5 minutos. Se separaron las NPs con ayuda del magneto, se descartó el sobrenadante y se agregaron 60 mL de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  0,34 M y se calentó a 90 °C con agitación magnética constante durante 30 minutos. Se dejó enfriar la solución hasta que alcanzó temperatura ambiente, se precipitaron las NPs con ayuda de un magneto y se removió el sobrenadante. Se agregaron 50 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ, se agitó hasta lograr la mayor dispersión posible y se dializó el preparado utilizando una membrana de corte 10 kDa, contra  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ ON. Se fraccionaron en alícuotas y almacenaron a 4 °C.

Las NPs utilizadas en este trabajo fueron sintetizadas y cedidas a nosotros por la Dra. Ilaria Armenia.

#### 4.3.13. Funcionalización de NPs con (3-Aminopropil) trietoxisilano (APTES)

A una alícuota correspondiente a 150 mg de NPs se le agregó 1,0 mL de una solución etanol: APTES (91:9 v/v). La reacción se incubó bajo agitación mecánica durante 1 hora a temperatura ambiente, y posteriormente se incubó 1 hora a 90 °C. Se lavaron las nanopartículas funcionalizadas con APTES (NPs-APTES) tres veces con H<sub>2</sub>O miliQ, y luego de cada lavado se separaron las NPs-APTES mediante centrifugación a 10000 rpm durante 5 minutos, y se removió el sobrenadante. Finalmente, se resuspendieron en H<sub>2</sub>O MilliQ mediante ultrasonido y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

#### 4.3.14. Funcionalización de NPs-APTES con 4-aminofenil-β-D-galactopiranosido (NPG)

Se resuspendió 4 mg de NPs-APTES en buffer borato de sodio 10 mM pH 8,0 y se sonicó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se suplementó con una solución 1,0 mg/mL de bis-sulfosuccinimidil suberato (BS3) en buffer borato 10mM pH 8,0, llevando a un volumen final de 1,0 mL con el mismo buffer. Se incubó en rototorque a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se agregó 1,0 mL de una solución de 4-aminofenil-β-D-galactopiranosido 4,0 mM en buffer borato de sodio 10 mM pH 8,0, y se incubó en rototorque a temperatura ambiente durante 2 horas. Pasado ese tiempo se precipitaron las nanopartículas con ayuda de un magneto y se lavaron 5 veces con 1 mL de buffer MES 10 mM, pH 5,5. Finalmente se resuspendieron en buffer MES 10 mM, pH 5,5 a una concentración no mayor a 1 mg/mL y se almacenaron a 4 °C.

#### 4.3.15. Inmovilización de la variante 25 de BTL 2 sobre NPG

Se incubaron cantidades equimolares de proteína (aproximadamente 85 pmoles) y galactosa unida a las NPG, en buffer MES 50 mM, pH 8,0, con agitación moderada en rototorque a temperatura ambiente durante 30 minutos. El proceso de inmovilización se monitoreó periódicamente mediante la medida de actividad en el sobrenadante de inmovilización, hasta que la misma fue constante, y mediante la cuantificación de la concentración de proteína en el sobrenadante mediante el método de BCA según técnica del proveedor (ThermoScientific, n.d.). En paralelo se realizó un control de estabilidad de las NP-G incubando una alícuota en las mismas condiciones en ausencia

de enzima. Una vez que la actividad en el sobrenadante fue constante, se removió el derivado con ayuda de un imán de neodimio, se separó cuidadosamente el sobrenadante, y se realizaron tres lavados del derivado con buffer MES 10mM, pH 5,5. Finalmente se almacenaron en el mismo buffer a 4 °C hasta su utilización.

#### 4.3.16. Funcionalización de NPs-APTES con sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) (ciclohexano-1-carboxilato) (sulfo-SMCC)

Se tomó una alícuota correspondiente a 1mg de NP-APTES, se precipitaron con ayuda de un magneto de neodimio, se removió el sobrenadante y se resuspendieron en buffer fosfato de sodio 20 mM, pH 6,5; se agregó sulfo-SMCC 3,9 mM para lograr una concentración final de 8  $\mu$ M en la mezcla de reacción y se incubaron con agitación suave en rototorque a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las NPs funcionalizadas (NPs-S) se precipitaron con ayuda de un imán, se descartó el sobrenadante, finalmente se resuspendieron en buffer MES 10mM pH 5,5 y fueron almacenadas a 4 °C hasta su utilización.

#### 4.3.17. Cuantificación de grupos tiol mediante técnica con 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB)

En una placa de ELISA, se incubaron 125  $\mu$ L de una dilución adecuada de muestra a analizar (enzima, NPs-S, estándar) preparada en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 8,0, con 25  $\mu$ L de una solución de DTNB 4 mg/mL en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 8,0. Se incubó a temperatura ambiente y protegido de la luz, con agitación mecánica constante, durante 15 minutos y se midió absorbancia a 412 nm. En el caso de las muestras de NPs-S, las mismas se precipitaron con ayuda de un magneto y se trasvasó el sobrenadante a la placa de ELISA. Los resultados se interpolaron en una curva de calibración realizada en paralelo, la misma se construyó a partir de una solución de cisteína 2,0 mM en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 8,0.

#### 4.3.18. Inmovilización sobre NPs funcionalizadas con sulfo-SMCC (NP-S)

Como paso previo se llevó a cabo la reducción de la cisteína presente en la enzima mediante la adición de ditioneitol (DTT) concentración final 100mM en buffer fosfato

de sodio 25 mM pH 7,0, y se incubó en rototorque a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se removió el exceso de DTT mediante gelfiltración de la muestra en columna PD-10 utilizando buffer MES 50 mM pH 5,5, para este procedimiento se siguieron las indicaciones proporcionadas por el fabricante (Healthcare, n.d.).

La inmovilización en este soporte se llevó a cabo incubando la solución de enzima reducida en buffer MES 50 mM, pH 5,5, con una alícuota de las NP-S en buffer MES 50 mM, pH 5,5, de forma que se mantengan cantidades equimolares de enzima y grupos tiol presentes en las NP-S, los cuales fueron determinados según técnica descrita en 4.3.16, la mezcla de reacción se incubó con agitación en rototorque a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Posteriormente se separó el derivado con ayuda de un imán de neodimio, y se retiró el sobrenadante. Se lavó el derivado 3 veces con buffer MES 50 mM, pH 5,5, resuspendiendo las nanopartículas cada vez, finalmente se resuspendió el derivado en buffer MES 50 mM, pH 5,5 y se almacenó a 4 °C hasta su utilización.

#### 4.3.19. Ensayos de actividad de los derivados frente a pNP butirato

Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en placa de ELISA, a temperatura ambiente, se realizaron triplicados de cada medida. La mezcla reactiva utilizada se compuso de 200  $\mu$ L pNP butirato de 0,5 mM en buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0, y 5  $\mu$ L de una suspensión 100 mg/mL del derivado a ensayar, se midió la liberación de pNP a 348 nm. El coeficiente de absortividad del pNP a 348 nm para el camino óptico en las condiciones mencionadas fue  $1.9 \times 10^{-3} \text{ mM}^{-1}$ .

#### 4.3.20. Ensayos de hipertermia magnética

Se incubó una alícuota equivalente a 0,049 UE de derivado BTL 2 NP-S con 1,2 mL de pNP butirato 0,5 mM en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0 (mezcla de reacción), esta mezcla se colocó en el equipo de hipertermia magnética (AMF D% nB Nanomagnetics) y se le aplicó un campo magnético pulsátil de 252 Gauss y 829 kHz ó de 300 Gauss y 710 kHz). La temperatura de la cámara de reacción se mantuvo constante a 21 °C. Al momento de la toma de muestra se separó el derivado mediante la ayuda de un

magneto, se tomó una alícuota de sobrenadante y se le midió absorbancia a 348 nm. La mezcla reactiva se resuspendió y continuó incubando en el equipo de hipertermia. Como control de actividad se incubó una alícuota igual la mezcla de reacción a 21 °C, durante el tiempo que duró el ensayo de hipertermia magnética y se midió la absorbancia a 348 nm para determinar la cantidad de pNP liberado.

## 4.4. Resultados y discusión

### 4.4.1. Purificación de las variantes de la lipasa BTL 2 de *Geobacillus thermocatenulatus*

Se llevó a cabo la producción y purificación de las cuatro variantes de la lipasa BTL 2 de *Geobacillus thermocatenulatus* mencionadas en la Tabla 4.1, a partir de las cepas de expresión de *E. coli* (AC XXV, AC XXVI y AC XXVII, AC XXVIII). La principal diferencia entre la variante 26 y las variantes 27 y 28, es que a estas se les reemplazó un aminoácido ubicado en una región específica, por una cisteína, siendo ésta la única cisteína presente en la estructura (ver tabla 4.1). Esta mutación cobra relevancia a la hora de llevar a cabo la inmovilización sitio dirigida de la proteína, pero no tiene significancia durante el proceso de producción y purificación de estas variantes (Godoy et al., 2011), por lo cual se desarrolló un único protocolo de purificación para las variantes de BTL 2 26, 27 y 28. Por su parte la variante 25 BTL 2 consiste de la enzima BTL 2 producida como proteína de fusión con el dominio de lectina de la toxina hemolítica formadora de poros de *Laetiporus sulphureus*. Este dominio presenta afinidad por galactosa o derivados de ella, lo que significa una ventaja a la hora de su purificación o inmovilización. Desde el punto de vista estructural, la inclusión de este dominio no afecta el plegamiento de la enzima, ni tiene efecto sobre su actividad catalítica (López-Gallego et al., 2012).

El cultivo de los mutantes se realizó en las condiciones descritas en 4.3.3, anteriormente optimizadas por el grupo de trabajo del Dr. Fernando López Gallego (Godoy et al., 2011). La purificación de la enzima nativa y las dos variantes monocisteína se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en 4.3.4, monitoreando el proceso mediante cuantificación de la actividad frente a pNP butirato según el protocolo descrito en 4.3.2. Dado que el comportamiento en el proceso de purificación para las tres variantes de BTL 2 (26, 27 y 28) fue similar, en la *Figura 4.2* se muestra a modo de ejemplo los resultados obtenidos en el proceso de purificación para la variante 27, evaluados mediante PAGE-SDS. Se partió de la fracción soluble del lisado de las células del clon AC XXVII, el cual presentó buena expresión de la enzima de interés como se aprecia en el carril 2 de la PAGE-SDS (*Figura 4.2*). A partir del resultado observado en el carril 3 se pudo concluir que la mayor parte de la enzima de interés fue adsorbida al soporte octil-agarosa

durante la HIC ya que no se aprecia ninguna banda de peso molecular similar al esperado (42 kDa) en las fracciones de percolado y lavados de la misma (carriles 3, 4 y 5), indicando que el tiempo de incubación y la cantidad de matriz hidrofóbica utilizada fueron adecuados para el proceso desarrollado. Al analizar el eluido de la cromatografía

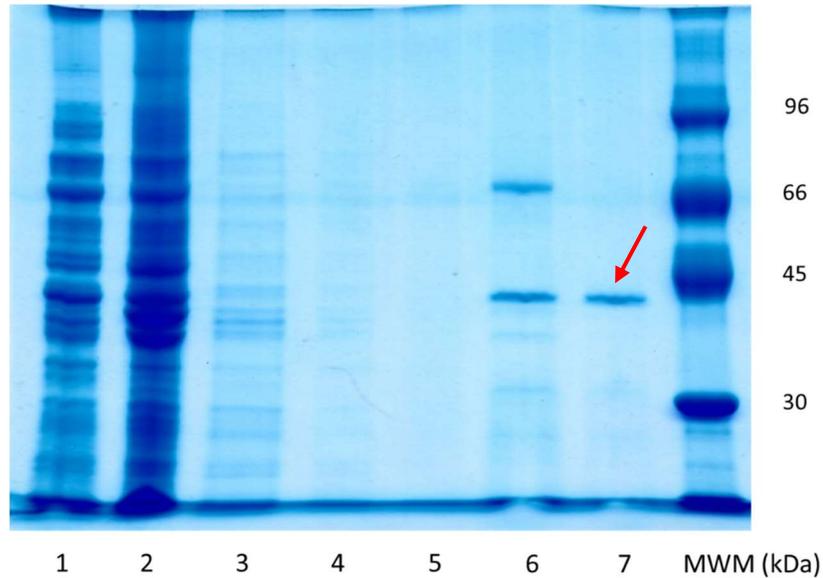


Figura 4.2. Evaluación del proceso de purificación de la variante 27 de BTL2, realizado mediante PAGE-SDS en gel homogéneo 12,5%, revelado con Coomassie coloidal. Carril 1 fracción soluble, carril 2 fracción insoluble, carril 3 percolado de la HIC, carriles 4 y 5 lavados 1 y 2 de la HIC, carril 6 eluido de la HIC, carril 7 percolado del intercambio iónico en DEAE -agarosa, carril 8 MWM (Low molecular weight marker, GE HealthCare). Tesis de Licenciatura de María Eugenia Cedrés.

hidrofóbica (carril 6) se constató que si bien en esta etapa se logró una gran purificación de la proteína de interés (42 kDa), la enzima no es la mayoritaria ni tampoco la única. Con el fin de remover las proteínas contaminantes se realizó una cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-agarosa a pH 7,0, donde se constató que la proteína de interés se encuentra cargada positivamente a dicho pH, ya que no se une a la matriz, mientras que las proteínas contaminantes si lo hacen. De esta forma mediante un paso más de purificación se logró obtener una fracción donde la proteína de interés es la mayoritaria como se puede apreciar en el carril 7.

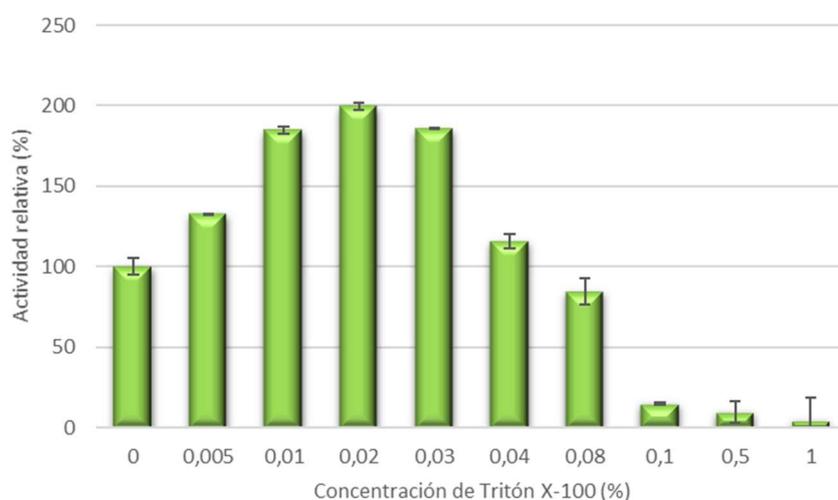
A la hora de evaluar el proceso de purificación se encontró que el Tritón X-100 utilizado para la elución de las proteínas adsorbidas en la HIC, causa la activación de la enzima de interés sobreestimando la actividad de las fracciones en los pasos posteriores por lo que no fue posible calcular el rendimiento global del proceso en actividad enzimática.

#### 4.4.2. Caracterización bioquímica de la variante 27 lipasa BTL 2 de *Geobacillus thermocatenulatus*

Se llevó a cabo una caracterización bioquímica parcial de la variante 27 de BTL 2, enfocada en los aspectos más relevantes de cara a la inmovilización y posterior aplicación de los derivados a los ensayos de hipertermia magnética.

##### 4.4.2.1 Estudio del efecto del Tritón X-100 sobre la actividad enzimática

El efecto activador del Tritón X-100 constatado durante el proceso de purificación, si bien es esperable para este tipo de enzimas no deja de ser de relevancia de cara a las posibles aplicaciones de la enzima, por lo que se decidió evaluarlo en mayor profundidad. Para ello se evaluó la actividad enzimática según el protocolo descrito en 4.3.2 suplementando la mezcla reactiva con concentraciones crecientes de este tensoactivo. En la *Figura 4.3* se puede apreciar que concentraciones de hasta 0,04 % v/v de Tritón X-100 en la mezcla de reacción tienen un efecto activador sobre la enzima en cuestión, siendo este máximo cuando la concentración se encuentra en 0,02 % v/v duplicando la actividad respecto a la enzima en ausencia de Tritón X-100. Mientras que la presencia a concentraciones superiores a 0,04 % tiene un efecto inhibitor sobre BTL 2. Este fenómeno es esperable para este tipo de enzimas con dominio tapa, ya que la presencia de este tensoactivo favorecería la conformación abierta de dicho dominio. Además, este dato marca la necesidad de incluir una etapa de diálisis al final del proceso

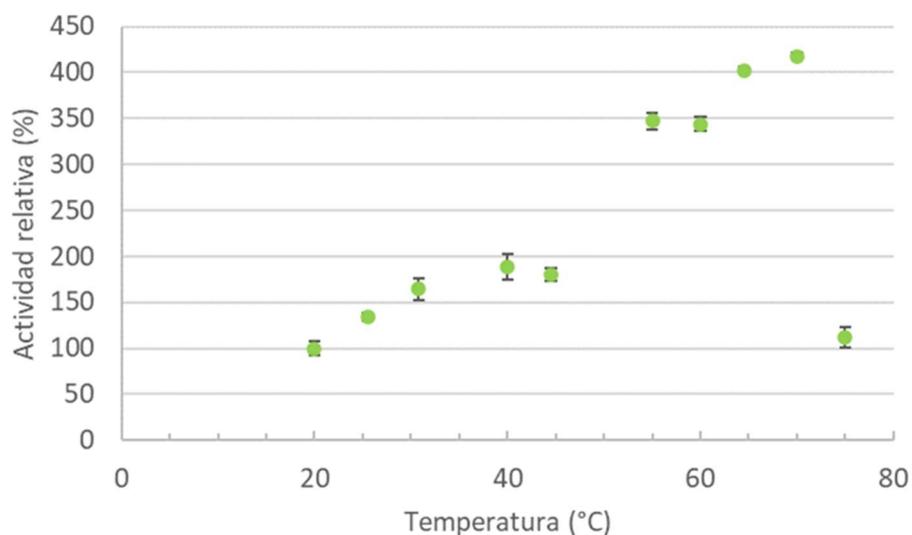


*Figura 4.3. Estudio del efecto del Tritón X-100 sobre la actividad enzimática. Los resultados se expresan respecto a la actividad mostrada en ausencia de Tritón X-100. Tesis de Licenciatura de María Eugenia Cedrés.*

de HIC. Mientras que la pérdida de actividad observada a concentraciones de Tritón X-100 superiores a 0,04% v/v podría deberse a que afecta la estructura de la enzima pudiendo provocar su precipitación (Amid et al., 2016).

#### 4.4.2.2 Estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad de BTL 2

La determinación de la temperatura óptima se llevó a cabo midiendo la actividad según lo descrito en 4.3.2, variando la temperatura según lo indicado en cada caso. En la *Figura 4.4* se muestran los resultados obtenidos durante el estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la variante 27 de BTL 2. Como se puede apreciar la actividad es afectada positivamente a medida que aumenta la temperatura, un aumento de temperatura de 20 °C respecto a la ambiente provoca una duplicación de la actividad. En el rango de 55 a 70 °C la actividad aumenta entre 3,5 y 4 veces respecto a la temperatura de referencia, mientras que a temperaturas superiores sufre



*Figura 4.4. Estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática. Se muestra la actividad relativa respecto a la expresada a temperatura ambiente. Tesis de Licenciatura de María Eugenia Cedrés.*

una drástica pérdida de actividad. Frente a estos resultados se puede afirmar que la temperatura óptima de la enzima se encuentra entre 60 y 75 °C, por lo que podemos catalogar a BTL 2 como una lipasa termófila.

#### 4.4.2.3 Estudio del efecto del pH sobre la actividad de BTL 2

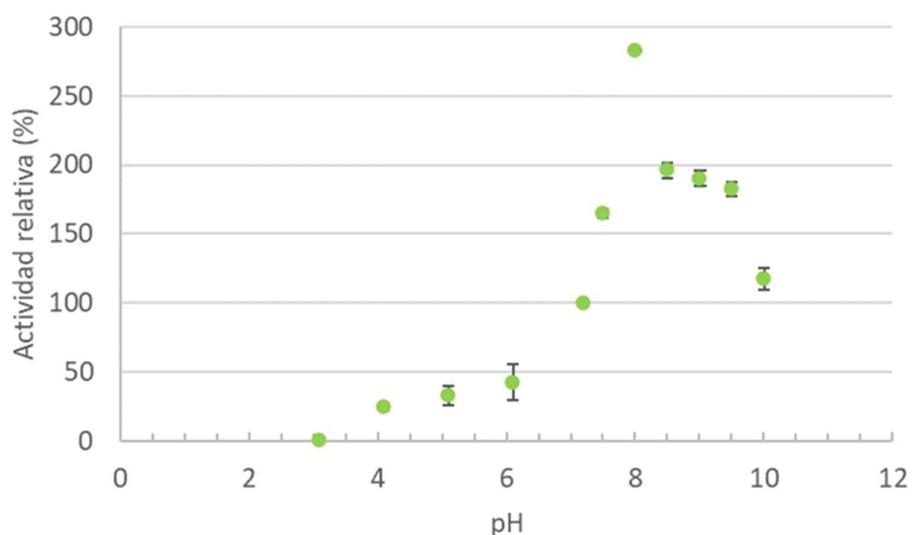


Figura 4.5. Estudio del efecto del pH sobre la actividad enzimática. Se muestra la actividad relativa respecto a la expresada a pH 7,0. Tesis de Licenciatura de María Eugenia Cedrés.

El estudio del efecto del pH fue desarrollado llevando a cabo el ensayo de actividad descrito en 4.3.2, cambiando el pH de la mezcla reactiva al valor indicado en cada caso. Como se puede apreciar en la *Figura 4.5* la enzima presenta un máximo de actividad aparente a pH 8,0, donde la misma es 2,7 veces la expresada a pH 7,0 de referencia. Fuera de este valor hay un estrecho margen de pH, entre 7,5 y 9,5 donde experimenta un aumento moderado de la actividad de aproximadamente dos veces respecto al pH de referencia, mientras que a pH menores a 7,0 la enzima sufre una pérdida gradual de actividad conforme disminuye el pH del medio de reacción. Los resultados observados nos permiten clasificar a BTL 2 como una lipasa alcalófila.

#### 4.4.2.4 Estudio del efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática

Se analizó la actividad de la enzima BTL 2 en las condiciones descritas en 4.3.2 en presencia de NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CoSO<sub>4</sub>, NiSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, a tres 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. Como se aprecia en la *Figura 4.6* la presencia de Ni<sup>2+</sup> 1mM y Cu<sup>2+</sup> 20 mM tiene un efecto activador sobre la enzima, mostrando más de 4 veces la actividad observada en ausencia de estos. Efecto contrario es el observado para el Zn<sup>2+</sup> dado que en todas las concentraciones ensayadas provoca una pérdida casi total de la actividad expresada, lo cual puede explicarse por la presencia

de un sitio de unión a  $Zn^{2+}$  presente en la estructura de la enzima, al unirse con este metal se promueve la formación de dímeros que dificulta el ingreso del sustrato al sitio

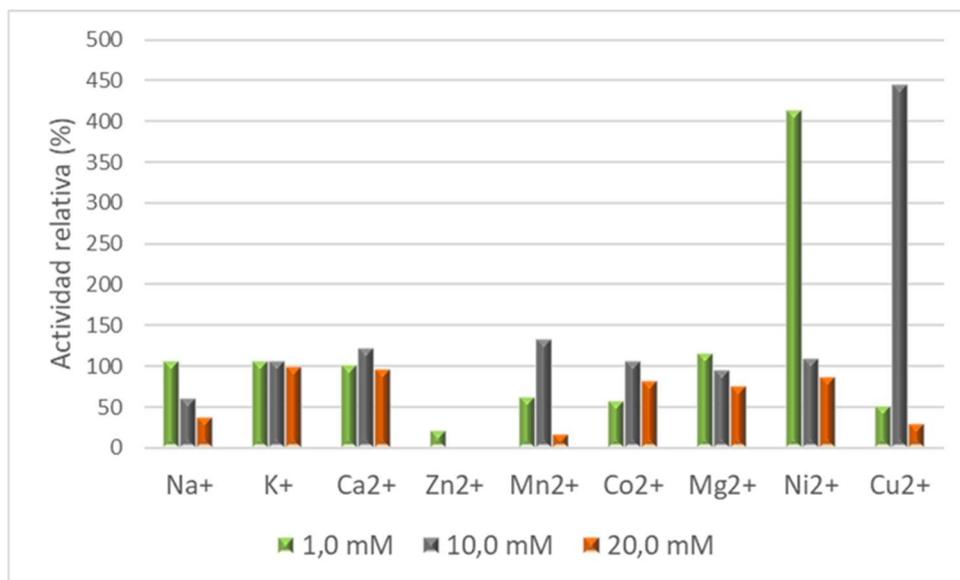


Figura 4.6. Efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática. La actividad relativa es comparada a la observada en ausencia del metal. Tesis de Licenciatura de María Eugenia Cedrés.

activo de la enzima provocando una disminución de la actividad. Se evaluó el efecto sinérgico de los metales activadores con Tritón x-100 0,02% v/v, no pudiéndose llevar a cabo las medidas de actividad, ya que los metales precipitaron en presencia del tensoactivo (Timucin & Sezerman, 2015).

#### 4.4.2.5 Evaluación de la estabilidad frente a la temperatura

En la *Figura 4.7* se muestra la actividad remanente de BTL 2 luego de una hora de incubación a la temperatura indicada en cada caso. En estas condiciones se puede apreciar que la enzima es completamente estable hasta 50 °C, y que a temperaturas

superiores comienza a perder actividad, con una pérdida del 50% a 60 °C, y pérdida total de actividad a temperaturas superiores.

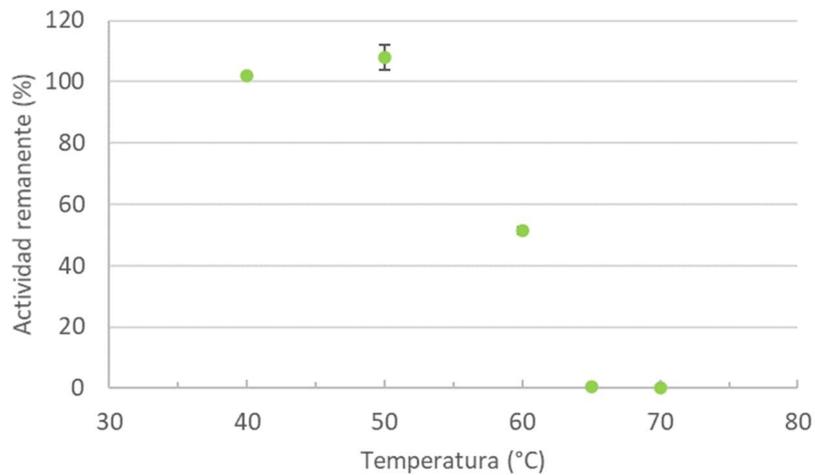


Figura 4.7. Estudio de la estabilidad frente a la temperatura. Se evaluó la actividad remanente luego de una hora de incubación respecto a la expresada previamente. Tesis de Licenciatura de María Eugenia Cedrés.

#### 4.4.2.6 Evaluación de la estabilidad frente al pH

Se realizó el estudio de la estabilidad frente al pH teniendo en cuenta las condiciones a las que se sometería a la enzima en los ensayos de inmovilización. Como se puede apreciar en la Figura 4.8, BTL 2 presenta muy buena estabilidad a pHs entre 5,0 y 7,0

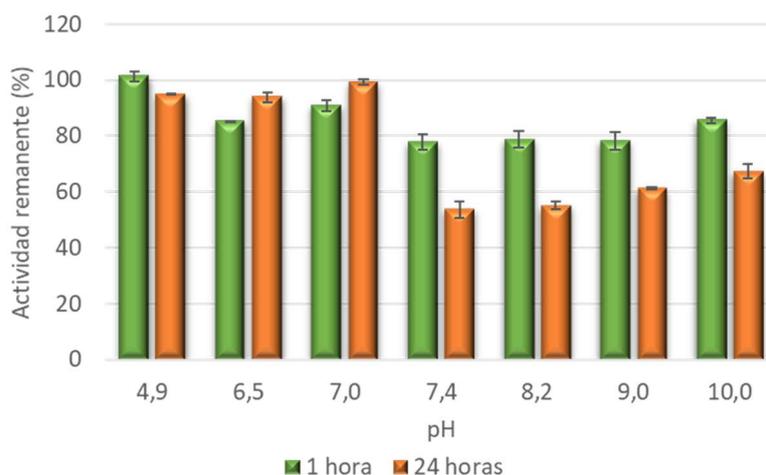


Figura 4.8. Estudio de la estabilidad frente al pH. Se evaluó la actividad remanente luego de ser incubada 1 y 24 horas al pH indicado en cada caso y se la expreso como actividad remanente respecto a la expresada previo a la incubación. Tesis de Licenciatura de María Eugenia Cedrés.

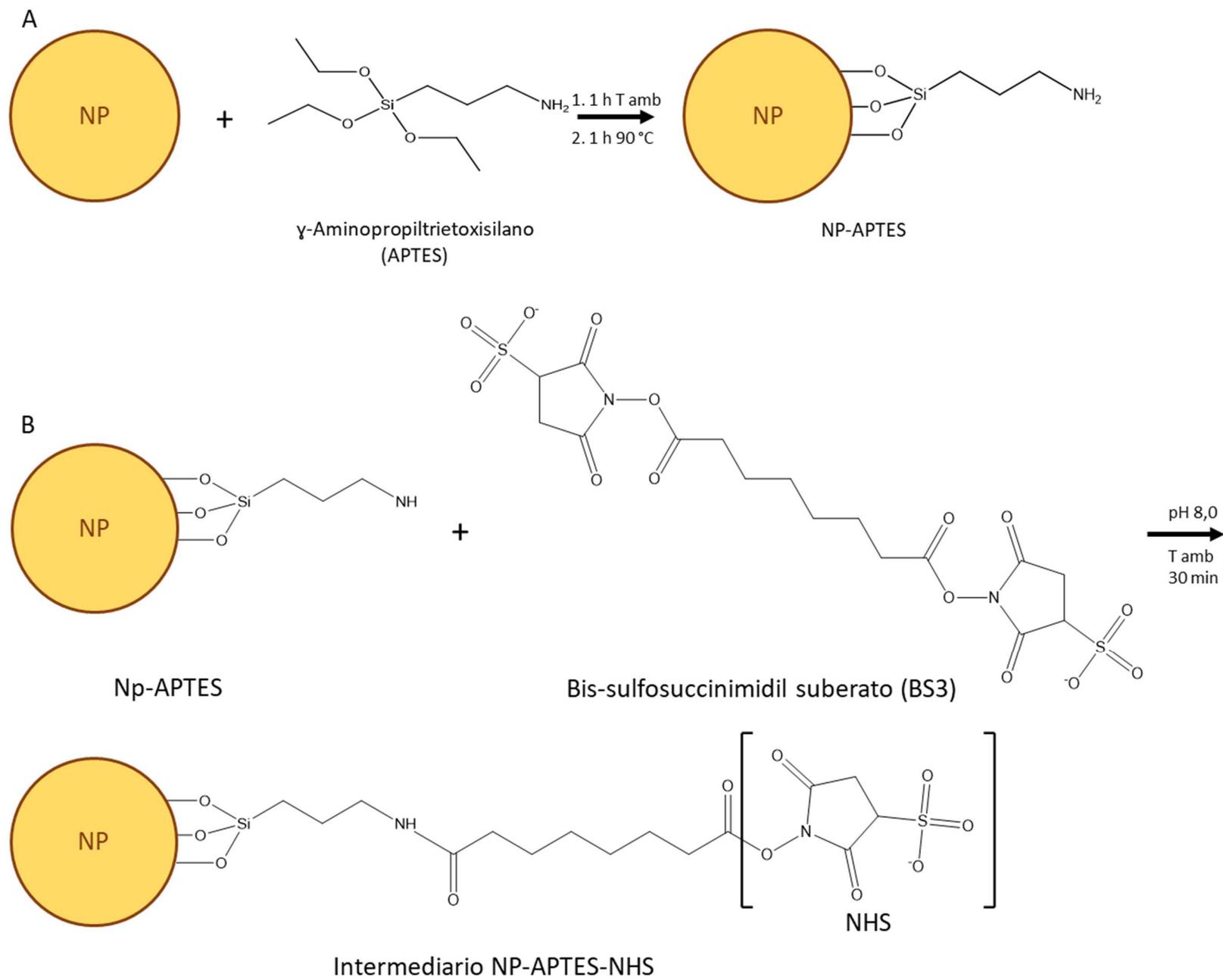
donde conservó más del 90 % de la actividad inicial. Mientras que a pHs superiores a 7,0 mostró una pérdida del 20 % de la actividad luego de una hora de incubación y entre 30 y 50 % de pérdida de actividad luego de las 24 horas de incubación. La estabilidad mostrada en el rango de pH 5,0 a 7,0, es una característica muy importante de cara al proceso de inmovilización al que se sometió posteriormente la enzima, ya que las nanopartículas utilizadas como soporte son estables en un rango muy reducido de pH de 5,0 a 5,5, exponerlas a pH diferentes puede llevar a su precipitación. Debido al estrecho margen de pH al cual es posible llevar a cabo la inmovilización, se evaluó también la estabilidad de las variantes 25, 26 y 28 a pH 5,5 y 7,0, en todos los casos la actividad remanente luego de una hora de incubación fue superior al 90 %. Esto permitió llevar a cabo los procesos de inmovilización en las condiciones de pH descritas en la metodología.

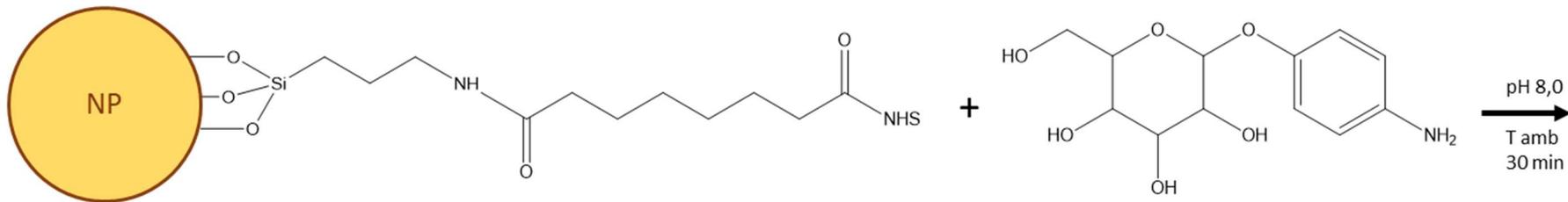
#### 4.4.3. Funcionalización de nanopartículas de óxido de hierro

En la *Figura 4.9* se esquematiza el proceso de funcionalización de las nanopartículas de óxido de hierro llevado a cabo para la obtención de los soportes utilizados en la inmovilización de las diferentes variantes de BTL 2. Como se puede apreciar en la *Figura 4.9 A*, el primer paso para la síntesis de los dos soportes desarrollados consiste en la funcionalización de las nanopartículas con  $\gamma$ -aminopropiltriétoxissilano (APTES), el cual provee un grupo amino como punto de partida para la posterior introducción de otros. La obtención de las NP-G se consigue mediante la reacción de las NP-APTES en primer lugar con Bis-sulfosuccinimidil suberato y posteriormente con 4-aminofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido, el cual será reconocido por el dominio de lectina presente en la variante 25 de BTL 2 (*Figura 4.9 B*). Por otra parte, la obtención de las NP-S a partir de las NP-APTES se lleva a cabo mediante la reacción de estas con sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) (ciclohexano-1-carboxilato) (sulfo-SMCC) (*Figura 4.9 C*), grupo con el cual interactuará el tiol de la cisteína introducida en las otras variantes de BTL 2.

Durante el proceso de funcionalización de las NPs, se debió llevar a cabo una caracterización física de las NPs mediante la determinación del potencial Z para conocer la carga de la partícula y la medición de la dispersión mecánica de la luz (DLS) para evaluar la homogeneidad del tamaño de las NPs funcionalizadas logrado. Sin embargo,

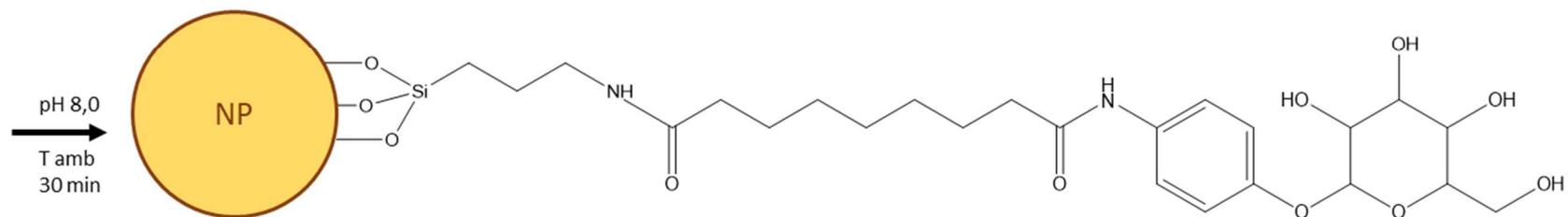
esta caracterización no se pudo llevar a cabo durante la estancia realizada debido a problemas operativos del equipo necesario para su realización. Dadas las circunstancias y la experiencia previa de mi supervisora en este trabajo, se decidió continuar adelante con los ensayos de inmovilización, ya que la funcionalización de las NPs es un proceso que no suele presentar mayores inconvenientes.



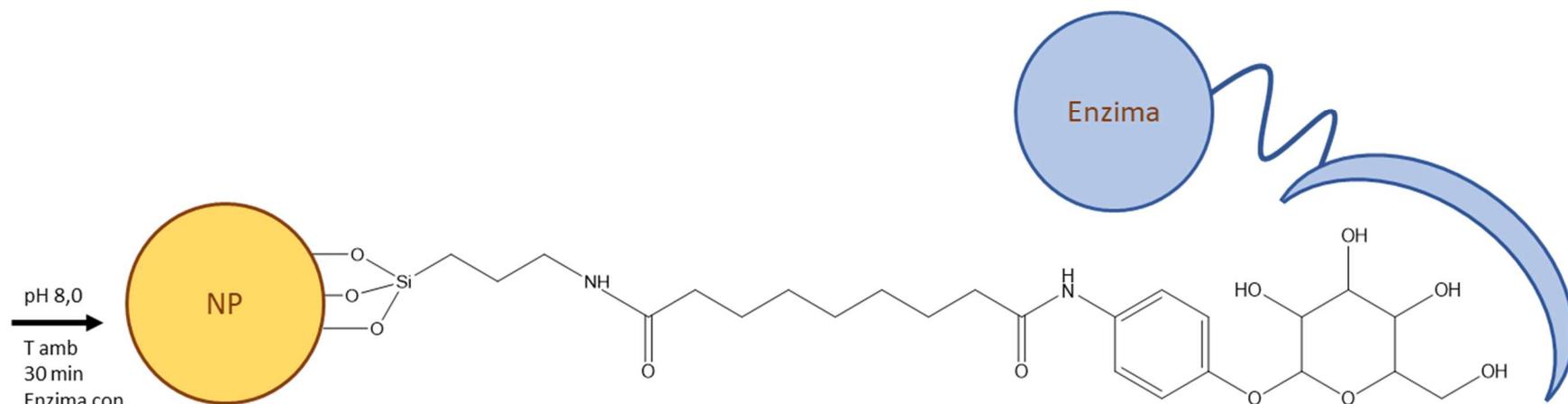


Intermediario NP-APTES-NHS

4-aminofenil-β-D-galactopiranosido



NP-G



NP-G

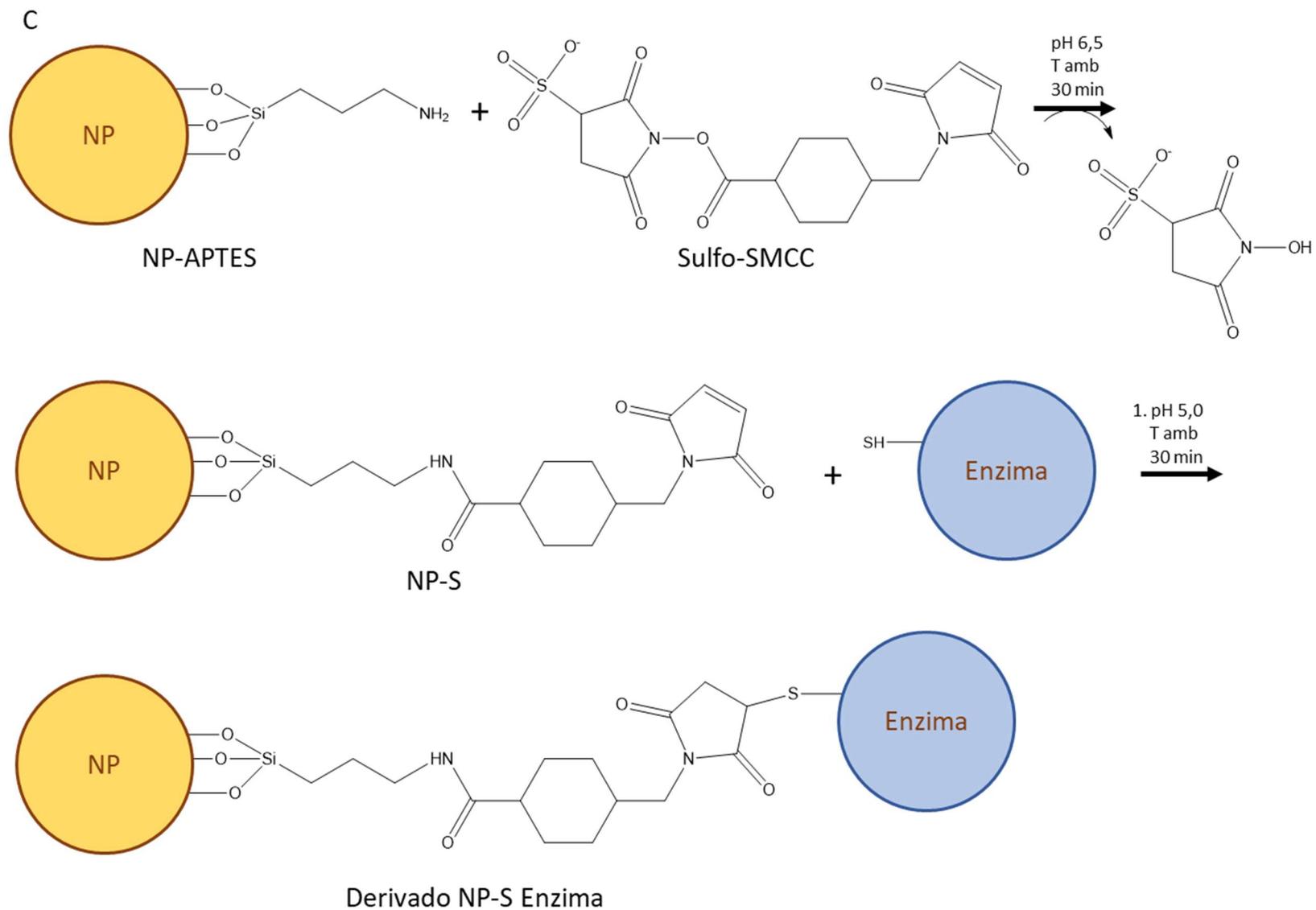


Figura 4.2. A Esquema del proceso de funcionalización de las NP con aminotrietoxi silano. B Esquema de inmovilización de la variante 25 de BTL en NP funcionalizadas con galactosa, mediante afinidad biológica. C esquema de inmovilización de las variantes 26, 27 y 28 de BTL 2 en NP funcionalizadas con sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) (ciclohexano-1-carboxilato).

#### 4.4.4. Inmovilización de BTL 2 sobre nanopartículas de óxido de hierro

##### 4.4.4.1 Inmovilización de la variante 25 BTL2 en NPs funcionalizadas con galactosa (NPG)

Se llevó a cabo la inmovilización de la variante 25 de BTL 2, sobre nanopartículas de óxido de hierro funcionalizadas con galactosa. En paralelo se llevaron a cabo tres controles. El primero consistió en realizar la inmovilización en presencia de galactosa 0,2 M, con el fin de evaluar si la interacción proteína NPG se da a través del dominio lectina; el segundo control consistió en remplazar las NPG con NPs-APTES con el fin de evaluar la adsorción inespecífica de la enzima sobre las nanopartículas, el tercer control consistió en NPs-APTES en presencia de galactosa. Con cada ensayo de inmovilización se incubó una alícuota de enzima soluble para evaluar la estabilidad de la enzima en las condiciones de inmovilización.

Se evaluó el proceso de inmovilización mediante la cuantificación de la actividad remanente en el sobrenadante de inmovilización, la actividad expresada por el derivado desarrollado, realizado en las condiciones descritas en 4.3.15 y la cuantificación de la concentración de la proteína remanente en el sobrenadante de inmovilización, mediante la técnica descrita en 4.3.3.

Tabla 4.2. Evaluación del proceso de inmovilización de la variante 25 de BTL 2 en NPG

Derivado	Galactosa	UE ofrecidas	AI (%)	AE (%)	Proteína inmovilizada (%)
NPG	No	0,011	98	57	98
NP APTES	No	0,011	98	57	99
NPG	Si	0,011	96	67	No determinado
NP APTES	Si	0,011	98	49	No determinado

En la *Tabla 4.2* se muestra el porcentaje de actividad inmovilizada (AI) calculada como la diferencia entre las UE ofrecidas al soporte y las UE presentes en el sobrenadante de inmovilización, expresado en forma porcentual respecto a las UE ofrecidas; la actividad expresada (AE) calculada como la relación porcentual entre las UE expresadas en el derivado y las UE inmovilizadas; y el porcentaje de proteína inmovilizada calculado como la diferencia entre los mg de proteína ofrecidos al soporte y los mg de proteína presentes en el sobrenadante de inmovilización, expresado en forma porcentual respecto a los mg de proteína ofrecidos.

En todos los casos se alcanzó un porcentaje de inmovilización (%AI) superior al 95%, lo cual es consistente con el porcentaje de proteína inmovilizada determinado en ausencia de galactosa. En presencia de galactosa no se determinó la concentración de proteína, ya que este azúcar al ser reductor interfiere en el método utilizado para la determinación.

Al analizar el proceso de inmovilización mediante la actividad expresada (% AE) se aprecia que en todos los casos es inferior al % AI, lo que indica que una fracción importante de la enzima se inmoviliza en forma inactiva. A su vez cuando se compara el % AE de las nanopartículas funcionalizadas con galactosa (NPG) con el % AE de las nanopartículas sin funcionalizar (NP APTES), se observa que son similares lo que indica que la inmovilización se estaría dando mayormente en forma inespecífica y no a través del dominio de lectina como se había planteado.

Los resultados de la inmovilización en presencia de galactosa en el medio mostraron que el % AE del derivado NPG (67 %) si bien fue mayor que el del control NP APTES (49 %) no llega a ser relevante ya que este último valor indica que la inmovilización se da mayormente de forma inespecífica.

#### 4.4.4.2 Inmovilización de las variantes 26, 27 y 28 de BTL 2 sobre nanopartículas funcionalizadas con sulfo-SMCC (NP-S)

Esta estrategia de inmovilización se basa en la formación de un enlace tioeter, que se ve favorecida a pH básicos. Las NP-S utilizadas como soporte para estos ensayos de inmovilización demostraron ser inestables fuera del rango de pH 5,0 a 5,5, cuando fueron incubadas durante 24 horas. En ese rango de pH ácido el ataque nucleofílico por parte del tiol está desfavorecido, por lo que se decidió aumentar el pH de la inmovilización a pH 7,0 e incubar a tiempos más largos de manera de favorecer la reacción. Para descartar la falta de estabilidad de las NP-S como causante de posibles problemas durante el proceso de inmovilización, en paralelo se incubó una alícuota de NP-S en ausencia de proteína en las mismas condiciones durante el tiempo que tuvo lugar la inmovilización.

En el primer intento de inmovilización se ensayó la inmovilización de las variantes de BTL 2 en cantidades equimolares con los grupos reactivos en las nanopartículas (611

pmoles), y se incubaron durante 3 horas. En ese período de tiempo se observó paulatinamente el aumento de la turbidez de la solución, hasta que finalmente las nanopartículas se agregaron y precipitaron, no lográndose su disgregación. Se descartó que la agregación fuera debido a la inestabilidad de las nanopartículas a pH 7.0 ya que en el control de inmovilización antes mencionado no se observó agregación. Adicionalmente se incubó un control de estabilidad de la enzima soluble en las mismas condiciones, el cual tampoco presentó precipitación de proteína, ni pérdida de actividad durante el tiempo evaluado. Una posible explicación a este comportamiento podría ser que una vez inmovilizadas las moléculas de enzima podrían interactuar entre sí, provocando la generación de agregados que conducen a la precipitación del derivado. Con el fin de evitar la agregación de las nanopartículas se ensayaron dos estrategias, la primera consistió en modificar la relación molar entre la enzima y los grupos reactivos en las nanopartículas a 1:4, de manera de ofrecer menos cantidad de proteína al soporte (condición 1, Tabla 4.3). La segunda estrategia mantuvo la misma relación equimolar entre la proteína y los grupos reactivos del soporte utilizados, pero se aumentó el volumen de reacción 4 veces, de esta manera se espera que diluyendo la mezcla de reacción se reduzcan la posibilidad de que las moléculas de enzima inmovilizadas interactúen de manera cruzada entre NPs, evitando la agregación (condición 2, Tabla 4.4).

Durante los ensayos de inmovilización se realizaron 2 controles, uno de estabilidad de la enzima en solución y otro de inmovilización utilizando las nanopartículas funcionalizadas con APTES para evaluar la adsorción inespecífica de la enzima al soporte. Se evaluó el proceso de inmovilización utilizando los mismos parámetros explicados en la Tabla 4.2

Tabla 4.3. Evaluación del proceso de inmovilización de las variantes 26, 27 y 28 de BTL 2, en la condición 1.

Derivado	Variante de BTL 2	UE ofrecidas	AI (%)	AE (%)	Proteína inmovilizada (%)
NP-S	26	0,013	71	32	73
NP-APTES	26	0,013	96	12	83
NP-S	27	0,013	41	56	53
NP-APTES	27	0,013	67	1	57
NP-S	28	0,013	95	249	87
NP-APTES	28	0,013	66	138	74

Como se puede apreciar en la *Tabla 4.3*, en los casos de las variantes 26 y 27 el porcentaje de AI es mayor en los controles de inmovilización sobre NP-APTES (nanopartículas sin funcionalizar) que sobre las NP-S (nanopartículas funcionalizadas). Esto indica que la enzima se inmovilizó mayormente por adsorción inespecífica y no a través de la química por enlace tioeter esperada. Esto era previsible para la variante 26 ya que se trata de la enzima que carece de cisteínas expuestas, pero no para la variante 27, la cual presenta una cisteína expuesta en la región opuesta al sitio activo.

Por su parte los resultados obtenidos para la inmovilización de la variante 28 muestran un mayor porcentaje de AI sobre las NP-S que su respectivo control, lo que podría indicar que una fracción de la enzima disponible se estaría inmovilizado a través de la química prevista.

La evaluación de los procesos de inmovilización medidos mediante la cuantificación del porcentaje de proteína inmovilizada acompaña la tendencia observada a través de la medición de AI.

Los controles de estabilidad de la enzima en solución y de las NPs, realizados en paralelo y en las mismas condiciones que la inmovilización, mostraron que tanto la enzima como el soporte son estables en dichas condiciones.

Al analizar la actividad expresada por los derivados, destaca el resultado obtenido para el derivado BTL 2 28 NP-S, donde se aprecia activación de la enzima producto de la inmovilización. Cabe recordar que esta variante presenta una sola cisteína ubicada en la cara interna del dominio tapa de la enzima, por lo que la inmovilización a través de dicho

aminoácido forzaría a la enzima a estar en su conformación abierta, dejando el sitio activo expuesto al medio de reacción y pudiendo ser la causa del efecto de activación observado. Por su parte los derivados BTL 2 26 NP-S y BTL 2 27 NP-S mostraron mayor porcentaje de AE que sus respectivos controles con NP-APTES, lo que podría indicar que la interacción entre la enzima y el soporte varía en función del soporte.

Tabla 4.4. Evaluación del proceso de inmovilización de las variantes 26, 27 y 28 de BTL 2, en la condición 2.

Derivado	Variante de BTL 2	UE ofrecidas	AI (%)	AE (%)	Proteína inmovilizada (%)
NPS	26	0,013	93	7	45
NP-APTES	26	0,013	94	5	34
NPS BTL 2 27	27	0,013	97	7	69
NP-APTES	27	0,013	90	4	46
NPS	28	0,013	99	12	70
NP-APTES	28	0,013	95	5	43

En la tabla 4.4 se muestran los resultados de las inmovilizaciones llevadas a cabo bajo la condición 2 anteriormente descrita. Los elevados porcentajes de AI de los derivados con NP-APTES nuevamente muestran que la interacción entre la enzima y el soporte es mayormente inespecífica. Los bajos porcentajes de AE expresados por los derivados responden a cambios en el estado de agregación de estos, durante el proceso de inmovilización se constató la precipitación de los derivados BTL 2 26 y BTL 2 27, y un aumento de la turbidez de la mezcla de reacción del derivado BTL 2 28 evidenciando un cambio en su estado de agregación. Paralelamente se llevaron a cabo controles de estabilidad de la enzima soluble y de las nanopartículas en ausencia de enzima, ambos en las mismas condiciones que los ensayos de inmovilización, no apreciándose ni precipitación de proteína ni agregación de las nanopartículas respectivamente en las condiciones del ensayo. Por lo que se puede afirmar que la precipitación observada está directamente relacionada con la inmovilización de la enzima sobre las nanopartículas.

A la hora de comparar los resultados obtenidos para las inmovilizaciones realizadas en las condiciones 1 y 2, resulta aventurado inferir acerca de lo observado para las variantes 26 y 27, ya que en la condición 2 las nanopartículas se agregaron y precipitaron totalmente. Por otro lado al comparar los resultados obtenidos para la inmovilización de la variante 28, indicarían que disminuir la relación moles de enzima:moles de grupos

reactivos en las nanopartículas (condición 1) podría disminuir la interacción proteína-proteína evitando que el derivado precipite. A la vez esta disminución de la concentración relativa de enzima podría estar favoreciendo la inmovilización orientada de la enzima en una conformación que favorece su actividad catalítica.

Si bien los derivados desarrollados no mostraron el comportamiento esperado para la estrategia de inmovilización diseñada, dada la restricción de tiempo para la realización de estas actividades se decidió proceder a los ensayos de hipertermia magnética utilizando el derivado BTL 2 28 NP-S desarrollado mediante la condición 1 debido a que fue el derivado que presentó mejor estabilidad frente a la agregación.

#### 4.4.5. Ensayos de hipertermia magnética

Se realizaron ensayos de hipertermia magnética en las condiciones descritas en 4.3.20, utilizando el derivado BTL 2 28 NP-S. Se estudiaron dos condiciones diferentes de magnitud y frecuencia del campo magnético aplicado a la muestra, pero no fue posible observar aumento de la actividad respecto a los controles aplicados.

Dado el comportamiento demostrado por los diferentes derivados desarrollados en relación a la baja estabilidad en solución y la tendencia a agregar que mostraron, es posible que el derivado empleado en este ensayo se encuentre en un estado de agregación que impide la vibración de las nanopartículas evitando su calentamiento.

### 4.5. Consideraciones finales del capítulo

El desarrollo de esta estancia de investigación en grupos de referencia en la temática me permitió conocer de primera mano las virtudes, desafíos y operativa de biocatalizadores inmovilizados en soportes que tienen propiedades superparamagnéticas. Estos conocimientos resultaron de gran importancia para la proyección de otras líneas de investigación en las que participo como la aplicación de lipasas a la síntesis de fármacos.

En resumen, en el marco de esta pasantía se desarrollaron protocolos para la producción y purificación de los mutantes de la enzima BTL 2, realizando la caracterización bioquímica parcial de la misma con el fin de la estabilidad de la enzima y establecer las mejores condiciones de inmovilización.

A partir de las nanopartículas de óxido de hierro sintetizadas por la Dra. Ilaria Armenia y cedidas a nosotros para la realización de este trabajo; se llevó a cabo la funcionalización de las mismas y su utilización para la inmovilización de los mutantes de BTL2. En base a los resultados preliminares obtenidos, sólo hay evidencia de inmovilización orientada por la mutación introducida para la variante 28 en el soporte NPS. Se deberían continuar la caracterización física y química de las nanopartículas y los derivados inmovilizados obtenidos, mediante la determinación del potencial Z, el índice de polidispersidad y la cuantificación de los grupos químicos presentes en la superficie de las nanopartículas.

Con los derivados desarrollados se realizó una primera aproximación a los ensayos de hipertermia magnética, teniendo en cuenta las incertidumbres que se acarrearán durante el desarrollo de los biocatalizadores no se pueden tomar los resultados como concluyentes.

Las nanopartículas con propiedades superparamagnéticas son materiales con notoria aplicación en el campo de la biomedicina donde existen numerosos reportes de su utilidad en el tratamiento de algunas líneas tumorales, o la liberación controlada de fármacos. En el campo de la biocatálisis la utilización de nanopartículas como soporte para la inmovilización de enzimas puede mejorar características de estas como fue mencionado en el capítulo anterior para soportes clásicos, sumado a esto las propiedades superparamagnéticas tienen gran proyección para ser utilizadas como soporte de algunos grupos de enzimas o la aplicación a determinados procesos. La inmovilización de enzimas termofílicas o hipertermofílicas sobre este tipo de soportes puede ser de utilidad para su aplicación en medios de reacción termolábiles o para la producción de compuestos sensibles a la temperatura.

Como perspectivas de este trabajo se encuentra la caracterización física de las NPs de óxido de hierro producidas (movilidad, potencial Z (mV), conductancia ( $\mu$ S)) lo cual no fue posible realizar al momento de la pasantía ya que el equipo (Zetasizer) necesario para dicha tarea se encontraba fuera de servicio durante mi estancia en el laboratorio, Actualmente estos ensayos se pueden llevar a cabo en la Facultad de Química ya que recientemente se adquirió el equipamiento necesario

# Capítulo 5

---

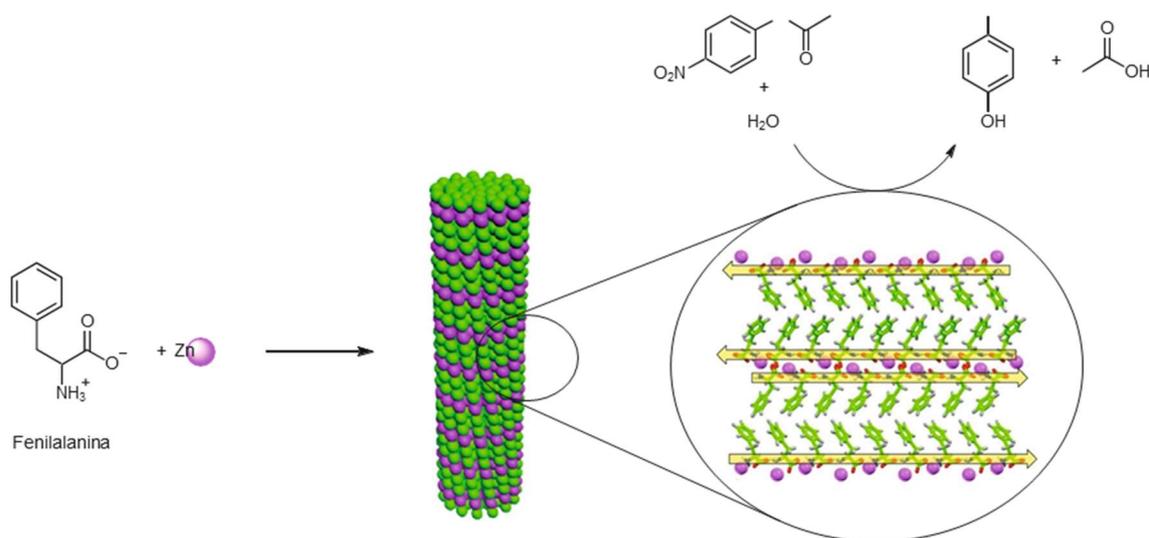


## Capítulo 5. Serendipia: ¿es la arginina capaz de catalizar la hidrólisis de p-nitrofenil butirato?

### 5.1. Introducción

Desde hace décadas se considera que existen dos clases de catalizadores, las enzimas y los metales. Sin embargo, en el año 2000 los investigadores Benjamin List y David MacMillan desarrollaron una forma alternativa de catálisis, la organocatálisis, que revolucionó la síntesis orgánica y los hizo acreedores del Premio Nobel en Química 2021. La organocatálisis, es el uso de una “pequeña” molécula orgánica, libre de metales, para catalizar una reacción. Además de enriquecer la química con otro tipo de estrategia catalítica, este enfoque tiene algunas ventajas importantes (Jen, Wiener, & MacMillan, 2000; List, Lerner, & Barbas, 2000). Los catalizadores basados en moléculas orgánicas pequeñas son generalmente estables y bastante fáciles de diseñar y sintetizar. A menudo se basan en compuestos no tóxicos, como azúcares, péptidos o incluso aminoácidos, y se pueden unir fácilmente a un soporte sólido, lo que los hace útiles para aplicaciones industriales. Sin embargo, la propiedad más atractiva de los organocatalizadores para los químicos orgánicos puede ser el simple hecho de que son moléculas orgánicas sencillas, que han aportado un sinfín de soluciones elegantes en catálisis asimétrica. Se han reportado reacciones catalizadas por moléculas tan pequeñas como el aminoácido prolina, en la síntesis de acetona Wieland-Miescher, condensación aldólica, reacción de Mannich, entre otras incluso es capaz de hacerlo de forma estereoselectiva (List et al., 2000; List & Yang, 2006; J. W. Yang, Chandler, Stadler, Kampen, & List, 2008). Una característica altamente deseable de la prolina como catalizador es su capacidad de llevar a cabo reacciones aldólicas de forma enantioselectiva, con diferentes sustratos que sirven como donante y aceptor en la adición. Por esta capacidad incluso la han llamado el “santo grial” en el campo de la catálisis asimétrica, ya que proporciona rutas simples para la obtención de productos de elevado interés, sin generar subproductos o desperdicios (Movassaghi & Jacobsen, 2002; Northrup & MacMillan, 2002).

Si bien este hecho es poco frecuente no es la única vez en la cual un aminoácido es capaz de catalizar una reacción, Makhlynets et al. reportaron el proceso de autoensamblado de una estructura supramolecular basada en fenilalanina en presencia de zinc (Makhlynets & Korendovych, 2019). Dicha estructura presentó actividad catalítica frente a la hidrólisis de pNP acetato, y mostró un comportamiento de tipo Michaelis-Menten, simulando así la actividad de una enzima esterasa (*Figura 5.1*).



*Figura 5.1. Estructura supramolecular autoensamblada de fenilalanina y Zn, capaz de catalizar la hidrólisis de pNP acetato. (Extraído de Makhlynets & Korendovych, 2019)*

El presente capítulo surge debido a la necesidad de explicar un fenómeno observado durante el proceso de purificación de Lip J2 descrito en 2.3.3. Durante dicho proceso se constató que diferentes fracciones que no contenían proteína eran capaces de hidrolizar el pNP butirato. La sospecha inicial se centró en que alguno de los componentes del buffer de replegamiento utilizado era capaz de hidrolizar el pNP butirato utilizado para evaluar la actividad de las diferentes fracciones del proceso. Por lo que se evaluó en forma aislada cada uno de los componentes de dicho buffer, constatándose que la L-arginina era la responsable de dicho efecto.

La L-arginina es un aminoácido proteico no esencial, que presenta diversas funciones biológicas y está involucrado en la síntesis de numerosas moléculas como la creatina, poliaminas y el ADN. Desde el punto de vista estructural destaca en su cadena lateral el grupo guanidinio, a través del cual la arginina es capaz de formar enlaces de hidrógeno e

interacciones iónicas, que resultan críticos para la estructura y estabilidad de las proteínas y complejos proteicos que constituye.

Debido al elevado pKa que presenta el grupo guanidinio (12,5) en condiciones fisiológicas se encuentra cargado positivamente, lo que le permite a la arginina actuar como regulador del pKa de grupos donadores o aceptores de protones, en sistemas de transferencia de protones en cascada como son los sistemas de bacteriorrodopsina o de citocromo c oxidasa; también se ha propuesto que cumple funciones ácido/ base general en algunos mecanismos enzimáticos. El estado de la carga, y por lo tanto el pKa de la cadena lateral de la arginina, juega un papel clave en estas funciones; incluso cuando se encuentra en ambientes no polares hidrofóbicos, como por ejemplo cuando está inmersa en el corazón hidrofóbico de una proteína o en la mitad de una bicapa lipídica, la cadena lateral permanece cargada positivamente, a diferencia de lo que ocurre con las cadenas laterales ionizables de otros aminoácidos como son lisina, histidina, tirosina, cisteína y los ácido aspártico y glutámico (Fitch, Platzer, Okon, Garcia-Moreno, & McIntosh, 2015; Guillén Schlippe & Hedstrom, 2005; Harms, Schlessman, Sue, & Bertrand García-Moreno, 2011; Nandi, Singh, & Thornton, 1993; Van Der Kamp, Perruccio, & Mulholland, 2008).

## 5.2. Objetivos del capítulo

### 5.2.1. Objetivo general

Estudiar la capacidad catalítica de la arginina sobre el sustrato modelo pNP butirato

### 5.2.2. Objetivos específicos

- Explorar la capacidad catalítica de la arginina
- Elucidar el mecanismo de interacción entre la arginina y el sustrato modelo utilizado

## 5.3. Materiales y métodos

### 5.3.1. Reactivos utilizados

Los reactivos que se listan a continuación fueron adquiridos de la empresa Sigma:

- L-arginina,
- Guanidina
- Citrulina
- Metil arginina
- Dimetil arginina simétrica
- 4-metilumbeliferil glucosa

Los siguientes reactivos fueron sintetizados en el laboratorio de síntesis orgánica de la Facultad de Química:

- Fenil butirato, sintetizado por la Lic. Grysette Daher
- Pentil guanidina, sintetizado por el Dr. Juan Carlos Ramos

### 5.3.2. Preparación de los reactivos

Durante los ensayos se comprobó que el pH de la mezcla de reacción juega un papel importante sobre el resultado, por lo que se tuvo particular cuidado en la preparación de todas las soluciones implicadas. Las soluciones de sustrato y de las moléculas evaluadas como potenciales catalizadores fueron preparadas en buffer fosfato 25 mM y el pH fue ajustado al valor deseado en cada caso.

### 5.3.3. Ensayo de hidrólisis de pNP butirato

Los ensayos de actividad se llevaron a cabo por triplicado, en placa de ELISA, en un espectrofluorímetro TECAN Infinite m200 Pro. Las reacciones fueron realizadas a pH 8,0 y pH 10,0. La mezcla reactiva utilizada se compuso de 50  $\mu\text{L}$  de pNP butirato 2,0 mM en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 8,0/10,0 y 50  $\mu\text{L}$  de una dilución del compuesto a evaluar, preparado en buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 8,0/10,0. Se midió la liberación de pNP a 348 nm, en modo cinético. En todos los casos se utilizó como blanco de reacción la misma mezcla de reacción sin catalizador. Para la cuantificación del pNP liberado se utilizó el coeficiente de absortividad a 348 nm, el cual es  $5.6 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 5.3.4. Ensayo de hidrólisis de derivados de metil umbeliferona

Los ensayos de actividad se llevaron a cabo por triplicado, en placa de ELISA para medida de fluorescencia, en un espectrofluorímetro TECAN Infinite m200 Pro. La mezcla reactiva utilizada se compuso de 50  $\mu\text{L}$  de MUF butirato/MUF- $\beta$ -D-glucopiranosido 0,8 mM en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 8,0 y 50  $\mu\text{L}$  de una solución de concentración conocida del compuesto a evaluar como catalizador, preparado en buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 8,0. Se midió la liberación de MUF en modo cinético ( $\lambda_{\text{ex}}$  372 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  445 nm). En todos los casos se utilizó como blanco la misma mezcla de reacción sin catalizador. Para la cuantificación del MUF liberado en las condiciones del ensayo se interpoló la fluorescencia en una curva de calibración realizada en iguales condiciones que el ensayo.

### 5.3.5. Búsqueda conformacional de las moléculas involucradas

Se realizó una búsqueda conformacional de las moléculas involucradas (arginina y pNP Butirato) mediante el software Molecular Operating Environment (MOE), utilizando el método LowModelMD. Se utilizó un campo de fuerza MMFF94x, sin cutoffs, con un gradiente RMS = 0,005 kcal/mol  $\text{\AA}^2$ , rejection limit = 100 (limite RMSD = 0,25  $\text{\AA}$ , ventana de energía = 7 kcal/mol) y límite de iteración = 10000. Se utilizó un término de solvatación del tipo Generalized Born Solvation model, con una constante dieléctrica de solvente de 80 (correspondiente a la del agua). Se seleccionaron finalmente las conformaciones de menor

energía. Este trabajo, al igual que el mencionado en los ítems 5.3.4.4 y 5.3.4.5 fue realizado por el Dr. Nicolás Veiga.

### 5.3.6. Docking molecular

Se partió de las estructuras antes optimizadas en agua, y se estudió la interacción de estas moléculas entre si a través de cálculos de docking molecular. Se utilizó el programa Gold, el cual utiliza un algoritmo genético para la búsqueda de las mejores posiciones de un modelo flexible de ambos sustratos. La arginina se consideró como enzima de un solo aminoácido. El sitio de unión fue toda la molécula de arginina. El proceso de docking se repitió 40 veces, y aquellas poses con mayor valor del parámetro *Goldscore* y *Chemscore* (a la vez) fueron seleccionadas y comparadas. El  $\Delta G$  del proceso de unión 1:1 fue estimado mediante la función *Chemscore*. Los demás parámetros del programa Gold fueron ajustados de acuerdo con los valores por defecto. Los resultados fueron analizados finalmente con el programa Discovery Studio Visualizer.

### 5.3.7. Dinámica molecular

Se partió de los aductos de docking molecular que mostraron mayor Goldscore. Se preparó el sistema en MOE, colocando en una caja periódica de aguas ( $x=36,9$ ;  $y=31,5$ ;  $z=30,5$ ). Se utilizó un campo de reacción electrostático (para solvatar implícitamente con agua). Campo de fuerza: AMBER12-EHT (parámetros para moléculas pequeñas: Teoría de Hueckel extendida).

Primero se optimizó la estructura hasta un gradiente de  $0,01 \text{ RMS kcal/mol } \text{Å}^2$ . Se ubicaron 1147 moléculas de solvente ( $d=0,98 \text{ g/cm}^3$ ). Se corrió una dinámica molecular con el algoritmo NPA (ecuaciones de movimiento Nosé-Poincaré-Andersen), conjunto NPT: equil { ps=100 T=298 P=101.325 r=(0.5,100) }; prod { ps=1000 T=298 P=101.325 } Time step = 0.002

## 5.4. Resultados

Tal como se mencionó anteriormente el fenómeno estudiado es una serendipia a lo largo del proceso de producción y purificación de Lip J2. Durante el paso de renaturalización de la enzima se constató que uno de los componentes del buffer de replegamiento (buffer Tiris HCl 100 mM, EDTA 5 mM, glutatión oxidado 1 mM, glutatión reducido 5 mM, arginina 300 mM, pH 9,6) era capaz de hidrolizar el sustrato pNP butirato utilizado para la evaluación del proceso de purificación. Se llevaron a cabo ensayos de hidrólisis de pNP butirato en las condiciones descritas en 5.3.3 utilizando cada uno de los compuestos constituyentes del buffer en forma aislada. De esta forma se constató que la arginina es el compuesto responsable de la hidrólisis del pNP butirato, y se planteó estudiar en mayor profundidad este fenómeno en función de la concentración de arginina y del pH del medio de reacción (8,0 y 10,0)

### 5.4.1. Liberación de pNP mediada por arginina

Una vez constatada la capacidad que presenta la arginina para catalizar la hidrólisis, se evaluó como variaba la misma en función de la concentración aplicada y del pH del medio de reacción. Para ello se evaluaron concentraciones de arginina entre 2,3 y 150,0 mM a pH

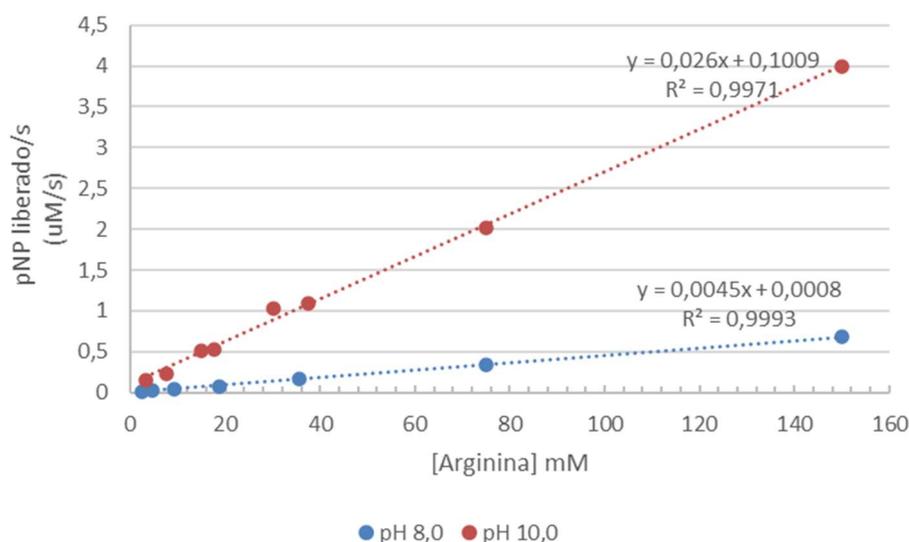


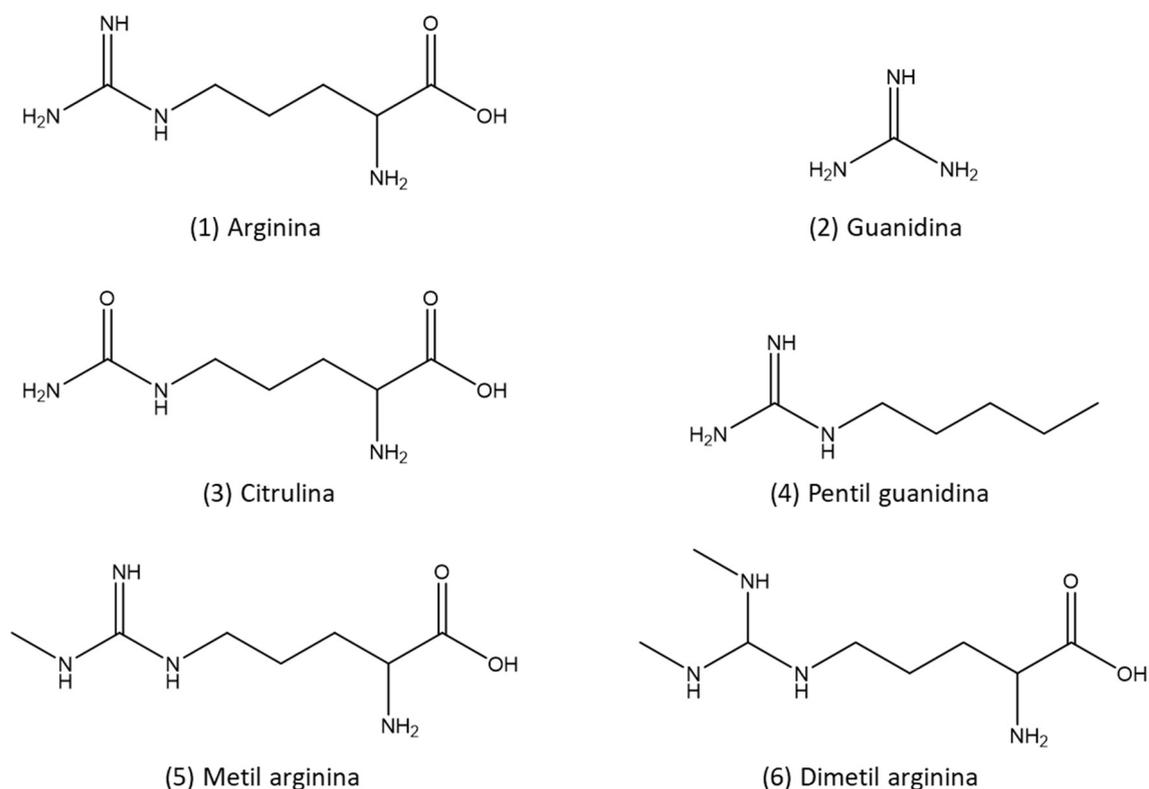
Figura 5.2. Efecto de la concentración de arginina sobre la velocidad de hidrólisis de pNP butirato, en azul se muestran los ensayos realizados a pH 8,0, en rojo se muestran los ensayos realizados a pH 10,0

8,0 y 10,0 manteniendo la concentración de pNP butirato constante (1,0 mM). Como se

muestra en la *Figura 5.2*. la velocidad de liberación de pNP aumenta de manera proporcional al aumento de la concentración de arginina, demostrando claramente que la misma está actuando como catalizador de la reacción. Al mismo tiempo dicho efecto se ve potenciado por el cambio de pH, donde se aprecia que a pH 10,0 la velocidad de liberación de pNP es seis veces superior a la observada a pH 8,0. Este efecto podría deberse a los diferentes estados de protonación de los grupos amino presentes en la molécula de arginina, donde el pKa del grupo alfa amino es 9.0 y el pKa del grupo guanidinio es 12.5 aproximadamente; mientras que a pH 10,0 solamente la imina del grupo guanidinio se encontrará protonada, a pH 8,0 también estará protonado el grupo alfa amino disminuyendo su nucleofilia. Adicionalmente, la especie nucleofílica que da lugar a la hidrólisis sería el agua a pH 8,0 y el hidroxilo a pH 10,0, siendo este último un nucleófilo mucho más potente.

#### 5.4.2. Estudio de la capacidad de catálisis de análogos de la arginina

Con el fin de elucidar el mecanismo de acción de la arginina **(1)** en la hidrólisis del pNP butirato, se estudió la capacidad catalítica de una serie de moléculas estructuralmente similares a ella (*Figura 5.3*), sobre la velocidad de la reacción de hidrólisis del pNP butirato. En todos los casos, al igual que en los estudios con arginina, se realizaron blancos de



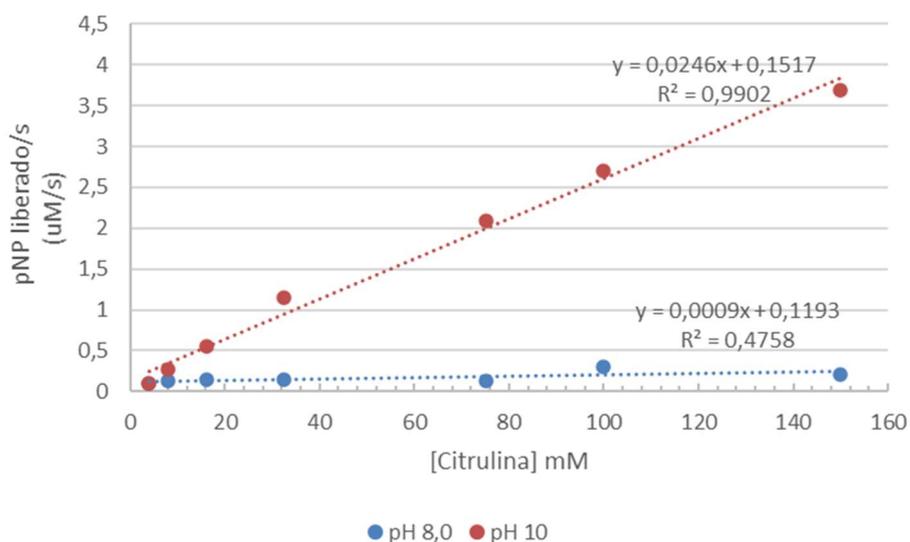
*Figura 5.3. Estructura química de los diferentes catalizadores evaluados.*

reacción en los cuales se evaluó la hidrólisis basal de pNP butirato ocurrida en las condiciones del ensayo. Las gráficas mostradas corresponden a los valores corregidos por la hidrólisis basal.

En primer lugar, se estudió si la sola presencia del grupo guanidinio era suficiente para catalizar la reacción. Para ello se estudió la hidrólisis del pNP butirato en presencia de guanidina **(2)** en concentraciones entre 2-200 mM, tanto a pH 8.0 como a pH 10.0, según el procedimiento descrito en 5.3.3. Los resultados demostraron que no hubo hidrólisis de pNP butirato a ninguna concentración y en ninguno de los dos pH estudiados. Esto lleva a pensar que el grupo  $\alpha$ -amino y/o el carboxilo, son necesarios para que se lleve a cabo la

interacción con el sustrato de interés o que se de la formación de un anillo que involucre la cadena carbonada.

En segundo lugar, se evaluó la capacidad catalítica de la citrulina (**3**). Como se aprecia en la *Figura 5.3*, la única diferencia entre la arginina y la citrulina es la sustitución del N de la imina del grupo guanidinio por oxígeno; por lo que permite evaluar la importancia de la presencia de dicho grupo para catalizar la hidrólisis del pNP butirato. Como se observa en la *Figura 5.4* a pH 10,0 la velocidad de hidrólisis del pNP butirato en presencia de citrulina mostró un comportamiento muy similar al observado con **1** a dicho pH, mientras que a pH 8,0 el compuesto **3** no fue capaz de catalizar la hidrólisis.



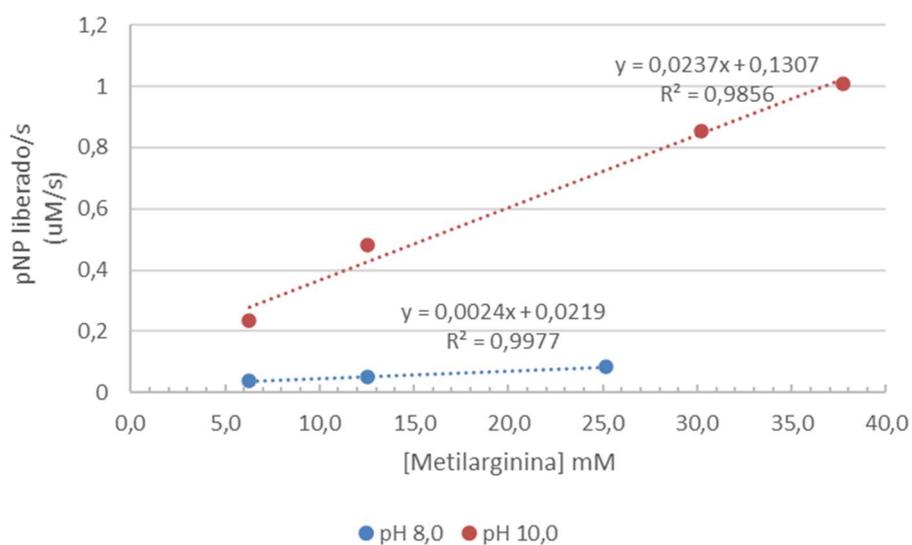
*Figura 5.4. Efecto de la concentración de citrulina sobre la velocidad de hidrólisis de pNP butirato, en azul se muestran los ensayos realizados a pH 8,0, en rojo se muestran los ensayos realizados a pH 10,0.*

En tercer lugar, se estudió la pentil guanidina (**4**), gentilmente sintetizada por el Dr. Juan Carlos Ramos, la cual fue empleada como sustituyente de la arginina en el procedimiento descrito en 5.3.3. Como se aprecia en la *Figura 5.3*, el compuesto **4** es un análogo de **7**, que carece de los grupos  $\alpha$  amino y carboxilo, lo que permitió evaluar el rol de estos grupos en la reacción de interés. Este compuesto no fue capaz de catalizar la hidrólisis del sustrato utilizado, lo que confirma que los grupos evaluados tienen un rol importante en la reacción de interés. Dada la geometría espacial de las moléculas involucradas una hipótesis es que

el grupo  $\alpha$  amino este interactuando con el grupo nitro del sustrato, formando un puente de hidrógeno que sirve para fijar la posición relativa de las moléculas.

En cuarto lugar, se evaluó la capacidad de metil (**5**) y dimetilarginina simétrica (**6**) para catalizar la hidrólisis de pNP butirato (*Figura 5.3*).

Como se puede apreciar en la *Figura 5.5*, el compuesto **5** es capaz de catalizar la hidrólisis del pNP butirato a pH 10,0, mostrando un comportamiento muy similar a **1**, mientras que a pH 8,0 muestra un comportamiento intermedio, bajando la pendiente a la mitad de la registrada con **1**. El compuesto **6** mostró un comportamiento muy similar (*Figura 5.6*).



*Figura 5.5. Efecto de la concentración de metilarginina sobre la velocidad de hidrólisis de pNP butirato, en azul se muestran los ensayos realizados a pH 8,0, en rojo se muestran los ensayos realizados a pH 10,0.*

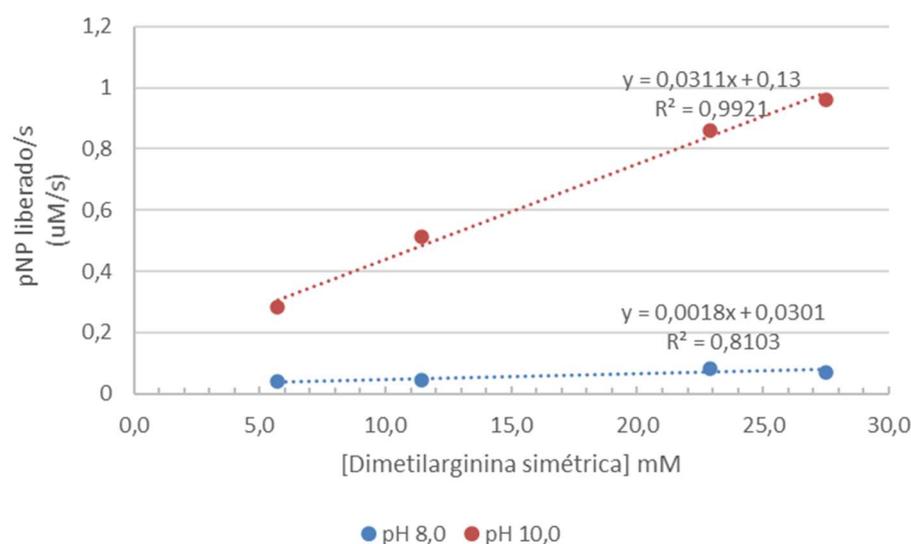


Figura 5.6. Efecto de la concentración de dimetilarginina simétrica sobre la velocidad de hidrólisis de pNP butirato, en azul se muestran los ensayos realizados a pH 8,0, en rojo se muestran los ensayos realizados a pH 10,0.

Para comparar la capacidad de catalizar la hidrólisis del pNP butirato de los diferentes compuestos evaluados se calculó la relación velocidad de liberación de pNP en función de la concentración del compuesto en cuestión en un rango de concentración 2-200 mM, ((µM pNP liberado/s)/mM compuesto evaluado).

Tabla 5.1. Comparación del comportamiento de los compuestos evaluados como catalizador

Compuesto evaluado	Relación vel/concentración	
	a pH 8,0	a pH 10,0
Arginina	0,0045	0,0260
Citrulina	0,0005	0,0250
Guanidina	0,0000	0,0000
Metil arginina	0,0024	0,0240
Dimetilarginina simétrica	0,0018	0,0310

Como se aprecia en la *Tabla 5.1*, el pH juega un rol fundamental en la reacción estudiada, ya que para todos los casos a pH 10,0 la velocidad de hidrólisis es mayor que a pH 8,0.

#### 5.4.3. Evaluación de la capacidad catalítica de la arginina sobre otros sustratos

Para tener más información sobre la naturaleza de la catálisis estudiada y dada la escasez de literatura sobre el fenómeno observado, se decidió estudiar la capacidad de la arginina

de catalizar la hidrólisis de otro tipo de sustratos. Para ello se propuso utilizar fenil butirato (**8**), el glucósido metilumbeliferil glucosa (**9**) y 4-metilumbeliferil butirato (**10**) (Figura 5.7). Se llevó a cabo el ensayo de actividad descrito en 5.3.3 sustituyendo el sustrato allí propuesto por **9**. Con el fin de evaluar el rol que cumple el grupo nitro se llevó a cabo la hidrólisis del compuesto **8**, la cual no se pudo evaluar ya que no se contó con un método de visualización adecuado. La arginina en las concentraciones ensayadas (4,2 a 150 mM)

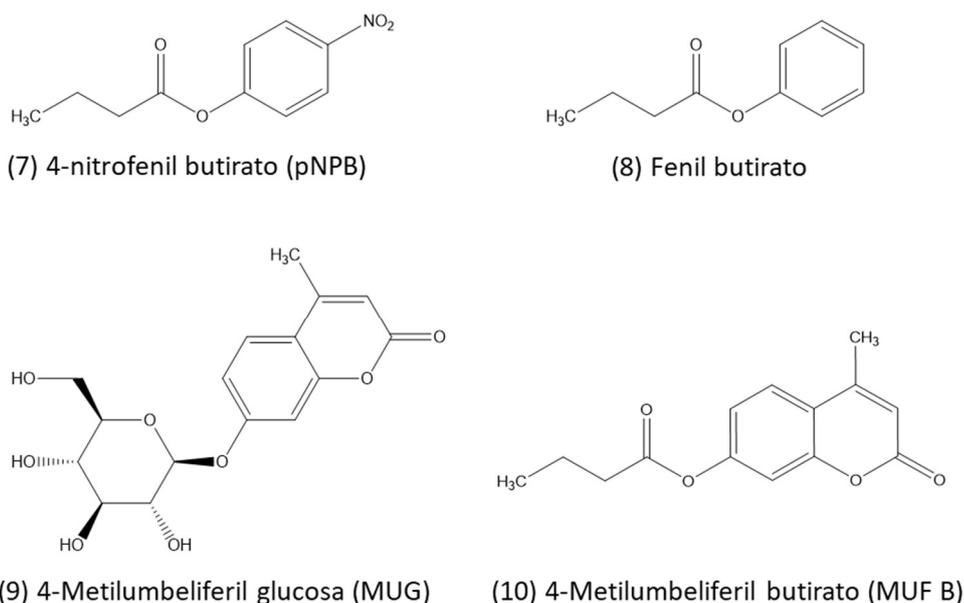


Figura 5.7. Estructura de los compuestos utilizados como sustrato.

no fue capaz de hidrolizar el enlace glicosídico del compuesto **9**, pero si catalizó la hidrólisis del enlace éster del compuesto **10** de forma similar a lo apreciado cuando se utilizó el compuesto **7** como sustrato. Este hecho nos llevó a pensar que la arginina mostraría especificidad por el tipo de enlace que cataliza la hidrólisis.

#### 5.4.4. Búsqueda conformacional y docking molecular de la arginina y pNP Butirato

Para realizar este análisis se planteó una colaboración con el Dr. Nicolás Veiga, quien aportó los ensayos de búsqueda conformacional, docking molecular y las dinámicas moleculares escritas en 5.3.5, 5.3.6 y 5.3.7 respectivamente, cuyos resultados se muestran a continuación. En la Figura 5.8 se esquematiza el perfil de reacción de **7** en ausencia (línea

discontinua) y presencia (línea continua) de **1**, llevado a cabo a pH 10,0. Se muestran las estructuras optimizadas mediante DFT (teoría de funcionales de densidad) para los puntos estacionarios, con los enlaces de hidrógeno, Van der Waals y enlaces covalentes de ruptura/formación representados como líneas punteadas, discontinuas y por tramos respectivamente (estructuras representadas en modelo stick). Para el primer estado(R) en presencia del compuesto **1** y el estado de transición 2 (TS2), también se muestra una representación de las interacciones débiles utilizando el método de interacción no covalente (NCI) (representación *balls and sticks*). La naturaleza de las interacciones se representa con diferentes colores, según la escala indicada. Como se puede ver en este último modelo, entre los reactivos(R), existe una zona de interacciones de tipo Van der Waals entre el grupo alfa amino de **1** y el grupo nitro del sustrato **7**, que sumadas a las interacciones de tipo  $\pi$ -sp<sup>3</sup>, serían las encargadas de fijar la posición relativa entre las dos moléculas, como se aprecia en el modelo *balls and sticks* del NCI de R. Mientras que en el otro extremo de las moléculas se puede apreciar la formación de un enlace de hidrógeno entre el amino del grupo guanidinio, con una molécula de agua, la cual interactúa con el carboxilo del pNPB como se puede ver en el estado de transición 1 (TS1), al tiempo que la amina secundaria del guanidinio de **1** interactúa con el oxígeno del carboxilo de **7** formando un enlace de hidrógeno. Estas interacciones conducen a un estado intermediario (I) en el cual se establecen nuevos enlaces de hidrógeno ente el  $\alpha$ -carboxilo y el grupo amino libre del guanidinio, para pasar a un segundo estado de transición (TS2) el cual conduce a la hidrólisis del éster y la obtención de los productos pNP y ácido butírico.

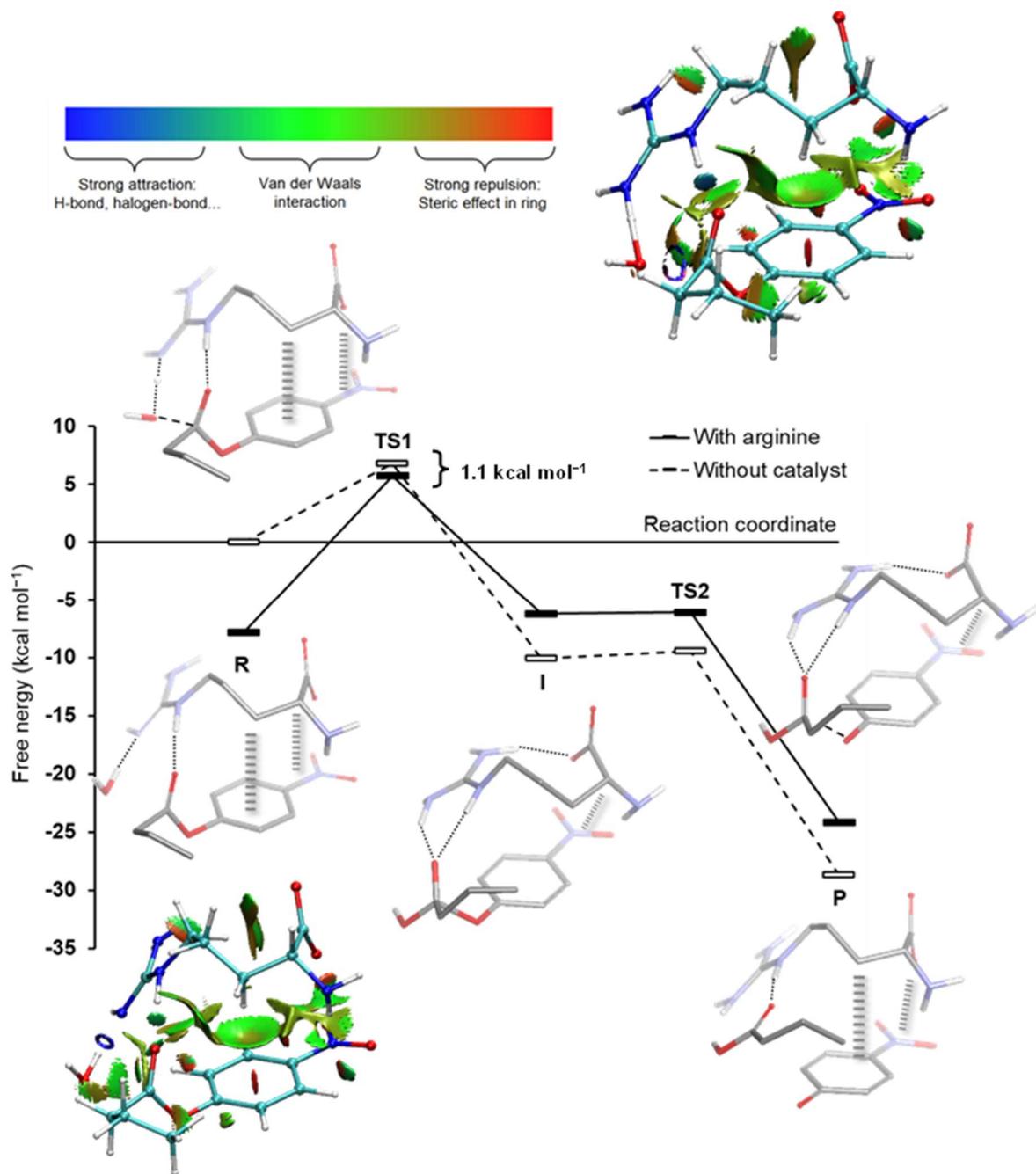


Figura 5.8. Esquema del perfil de reacción de arginina con pNP Butirato, a pH 10,0, basado en el modelado de la reacción. Gentileza del Dr. Nicolás Veiga.

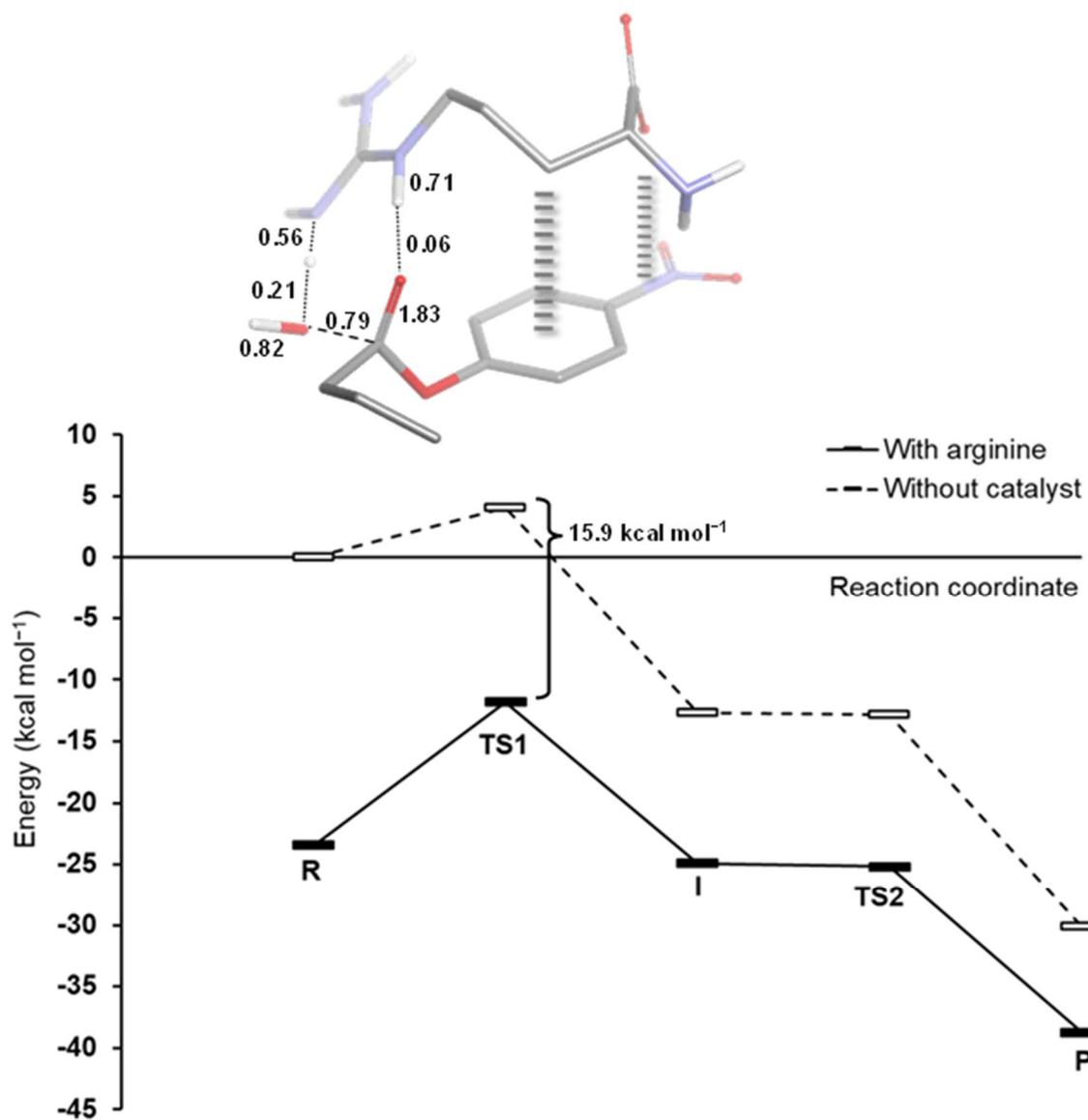


Figura 5.9. Diagrama de energía en función de la coordenada de reacción para la hidrólisis de pNP butirato mediada por arginina según surge del modelado realizado. Gentileza del Dr. Nicolás Veiga.

En la *Figura 5.9* se muestra la energía en función de la coordenada de reacción, para la hidrólisis básica de **7** en ausencia (línea discontinua) y en presencia (línea continua) de **1** de acuerdo al modelo construido. Se muestra la estructura optimizada por DFT para el primer estado de transición (TS1) en presencia de **1**, con los enlaces de hidrógeno, Van der Waals, y enlaces covalentes de ruptura/formación representados con líneas punteadas, discontinuas y por tramos respectivamente. Como se observa, la reacción transcurre por estados de menor energía cuando es llevada a cabo en presencia de **1**, lo que explicaría la capacidad catalítica de este aminoácido para la reacción planteada.

## 5.5. Discusión

A partir del descubrimiento casual de que la arginina cataliza la hidrólisis del pNP butirato, decidimos realizar ensayos complementarios que nos permitieran entender más sobre este hecho. De esta manera se observó que ni la sola presencia del grupo guanidinio ni la pentil guanidina son capaces de catalizar la hidrólisis del sustrato empleado en ninguno de los pH evaluados, sino que es necesaria la molécula completa de arginina. Estos resultados concuerdan con los modelos de docking simulados con las estructuras optimizadas de la arginina y el pNP butirato, donde se observa en el mecanismo de catálisis propuesto la importancia de la presencia tanto de los grupos amino y carboxilo del carbono  $\alpha$  como de las aminas presentes en la cadena lateral del aminoácido, de manera de que se establezcan las interacciones necesarias con el sustrato para el avance de la reacción.

Los demás análogos de la arginina estudiados (citrulina, metil arginina y dimetil arginina) también fueron capaces de catalizar la hidrólisis a pH 10,0 mostrando menor capacidad de catálisis que la arginina a pH 8,0, disminuyendo a la mitad para metil y dimetil arginina y en un orden para citrulina.

La velocidad de formación de pNP en función de la concentración de catalizador observada es similar para la arginina, la metil arginina y la dimetil arginina simétrica lo cual era esperable ya que la metilación de las aminas no altera el pKa ni el estado de protonación de la cadena lateral del aminoácido (Evich, Stroeve, Zheng, & Germann, 2016).

En cuanto a la diferencia de velocidad apreciada al llevar a cabo la reacción a pH 10,0 o pH 8,0 puede responder a que a pH 10,0 el oxhidrilo se comporta como mejor nucleófilo que la molécula de agua.

Los resultados obtenidos hasta el momento son muy novedosos ya que se trataría según entendemos del segundo aminoácido con capacidad catalítica reportado hasta el momento. Además de enriquecer a la química con un nuevo tipo de catalizador, la utilización de pequeñas moléculas orgánicas presenta algunas ventajas frente a los catalizadores clásicos, generalmente son estables, fáciles de utilizar, pueden ser fácilmente unidos a un soporte sólido, son moléculas simples y tienen la capacidad de introducir quiralidad sobre las moléculas que actúan. Por otra parte, la simpleza de su estructura lo hace más resistente a las condiciones ambientales que moléculas de mayor porte como las enzimas, las cuales pueden ver afectada su funcionalidad por variaciones en su estructura provocadas por condiciones de reacción adversas.

Sin lugar a duda queda mucho por estudiar en torno al fenómeno constatado, como la capacidad de catalizar la hidrólisis de otros sustratos similares de diferente largo de cadena, con el fin de demostrar si presenta selectividad por alguno de ellos. O también su aplicabilidad en otras condiciones de reacción simulando procesos de síntesis.

## Conclusiones y perspectivas

---



## Conclusiones y perspectivas

Este trabajo de tesis se enfocó, en su comienzo, en el desarrollo de herramientas biocatalíticas basadas en lipasas que permitieran su aplicación a la síntesis de biodiesel.

Como primer objetivo, se planteó la identificación y purificación de una enzima con actividad lipasa presente en el sobrenadante de cultivo de una cepa de *Janibacter sp* aislada de una muestra de suelo de la Antártida. Inicialmente el interés sobre esta enzima fue su capacidad de conducir la síntesis enzimática de biodiesel, lo cual fue probado en ensayos previos mediante la aplicación del liofilizado del sobrenadante de cultivo de dicha cepa.

Mediante estrategias de purificación clásicas se logró aislar una fracción proteica con actividad lipasa, la cual se denominó Lip J1. Se intentó su identificación mediante MALDI-TOF y comparación de secuencia en base de datos, pero no se encontró homología con ninguna enzima reportada hasta el momento. Lip J1 mostró baja capacidad para hidrolizar trioleína con lo cual fue descartado su uso para conducir la síntesis de biodiesel

Como alternativa para la identificación de la enzima de interés, se diseñó en paralelo una estrategia molecular, la cual permitió identificar un gen codificante para una lipasa y que presentó homología con un gen anotado como lipasa en el genoma de *Janibacter hoiley*. Se desarrollaron numerosos sistemas de expresión basados en diferentes cepas de microorganismos procariotas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas sp*) y eucariotas (*Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*), que de acuerdo a literatura han sido utilizados con éxito para expresión de lipasas. Se exploró la producción tanto intra como extracelular obteniéndose resultados dispares. Finalmente, a partir de la comparación de los diferentes sistemas, se seleccionó uno basado en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) en el cual la enzima se expresó en alto rendimiento como cuerpos de inclusión, y a partir del cual se llevó a cabo la producción y purificación de la enzima denominada LipJ2.

La caracterización bioquímica de LipJ2 reveló que la misma tiene propiedades muy novedosas y destacables caracterizándose como una lipasa alcalófila, termófila y halófila que la hacen potencial candidata a diferentes aplicaciones que requieren de estas propiedades.

El análisis estructural de la proteína producida confirmó la presencia de estructuras como el pentapéptido GX SXG característico de las lipasas, así como la presencia de la serina

catalítica, evidenciándose además una elevada proporción de aminoácidos hidrofóbicos principalmente concentrados en la región del sitio activo.

Finalmente, la falta de homología de secuencia con otras lipasas reportadas llevaron a categorizarla como el primer miembro de una nueva familia de lipasas, la Familia XVII.

Dadas las dificultades encontradas en la producción y purificación de las lipasas provenientes de *Janibacter*, se decidió recurrir a un preparado enzimático comercial que incluyera una enzima novedosa capaz de llevar a cabo la reacción de interés. De esta forma se seleccionó el preparado AMANO A12, el cual está compuesto por una mezcla de enzimas con actividad lipolítica. Se logró establecer un protocolo de purificación de una enzima con actividad lipasa a partir del preparado comercial, la cual fue caracterizada respecto a los parámetros operativos más relevantes para la síntesis de biodiesel. La actividad de la lipasa AMANO fue máxima a temperaturas moderadamente elevadas (50 °C) y cuando fue incubada a 40 °C a tiempos suficientemente largos (96 horas) se observó un estado parcialmente activo de la enzima con un porcentaje de actividad remanente de aproximadamente 50 % que hace posible su aplicación en reacciones que requieran incubaciones largas. Además, se determinó que la actividad enzimática no varía en presencia de etanol, metanol y glicerol a concentraciones de hasta 10%. Esta caracterización resultó promisorio para su aplicación en biodiesel, por lo cual se estudió la preparación de derivados inmovilizados de esta enzima. En este sentido se lograron desarrollar tres derivados utilizando diferentes estrategias y químicas de unión. Si bien el proceso de inmovilización fue exitoso con las tres estrategias utilizadas (porcentajes de inmovilización mayores a 90%) solo para dos de ellos, los derivados unidos a través de enlace isourea (AMANO-CDAP) y amida (AMANO-carboxilos) se lograron buenos porcentajes de actividad expresada. Los derivados inmovilizados AMANO-carboxilos y AMANO-azúcares lograron una notable estabilización frente a la temperatura (40 °C), conservando más del 90 % de la actividad inicial luego de 96 horas de incubación, lo cual resulta muy prometedor para su aplicación a la reacción de interés.

Teniendo en cuenta los resultados mostrados durante el desarrollo del derivado inmovilizado y la estabilización frente a la temperatura, se seleccionó el derivado AMANO-carboxilos para ser aplicado en la reacción de síntesis de biodiesel. Resta completar la

caracterización de este derivado, así como estudiar su *performance* en la síntesis de biodiesel.

La realización de la pasantía en la Universidad de Zaragoza permitió formarme en la utilización de técnicas de funcionalización de nanopartículas, nanocalentamiento mediado por campos magnéticos alternados, y su aplicación a reacciones enzimáticas. Esta técnica presenta gran potencial para su aplicación a derivados inmovilizados de lipasas termófilas como Lip J2.

A lo largo de todo el trabajo de tesis nos enfrentamos con resultados inesperados que obligaron a tomar caminos diferentes a los planificados. Uno de ellos es sin lugar a dudas el que nos condujo a plantear el último de los objetivos del presente trabajo.

La constatación de la capacidad catalítica de la arginina frente al sustrato pNP butirato fue un hecho sorprendente para nuestro grupo de trabajo, y el desarrollo de una estrategia de estudio de este fenómeno fue un desafío dado que la temática se encuentra alejada de nuestra área de *expertise*. La conformación de un grupo de trabajo interdisciplinario con la participación del Dr. Nicolás Veiga y el Dr. Gustavo Seoane, junto con mis orientadoras, fue determinante para proponer una hipótesis de trabajo, desarrollar las pruebas necesarias e interpretar los resultados obtenidos.

De este modo logramos proponer un modelo de reacción para la catálisis de la hidrólisis de pNP butirato mediada por arginina. Adicionalmente pudimos demostrar que los cálculos computacionales llevados a cabo por el Dr. Veiga, mostraron una muy buena correlación con la evidencia del laboratorio, cuando se compararon los resultados obtenidos con la arginina y diversos análogos propuestos (citrulina, guanidina, metil arginina, dimetil arginina y pentil guanidina), lo que permitió explicar el rol de cada uno de los grupos funcionales que participan en la interacción que lleva a la hidrólisis.

Según entendemos se trataría del tercer caso reportado de un aminoácido con capacidad catalítica, la escasa bibliografía relacionada con este fenómeno y la gran relevancia que tiene la existente, nos marca el compromiso de profundizar en el estudio de la arginina como catalizador. Sería deseable, conocer la estereoselectividad de la reacción, así como estudiar su especificidad de sustrato y versatilidad para catalizar otro tipo de reacciones como se ha visto con la prolina.

En resumen, la presente tesis contribuyó a la caracterización de nuevas lipasas, particularmente de la lipasa LipJ2 de *Janibacter*, lipasa extremófila perteneciente a una nueva familia de lipasas, debido a su potencial continuaremos explorando su uso en otras aplicaciones biotecnológicas. Asimismo, se desarrollaron derivados inmovilizados para la lipasa AMANO, los que serán evaluados a la brevedad en la síntesis de biodiesel. En el curso de la tesis se obtuvieron conocimientos sobre inmovilización en nanopartículas e hipertermia magnética los cuales serán sin duda capitalizados por el grupo de trabajo. Finalmente, la descripción de actividad catalítica asociada con arginina resulta sumamente interesante desde un punto de vista básico, y abre puertas a profundizar en el estudio de un aminoácido que pueda tener aplicaciones interesantes en organocatálisis.

# Medios de cultivo

---



#### 5.4.5. Medios de cultivo

##### 5.4.5.1 Lysogeny Broth (LB)

Extracto de levadura ..... 5 g  
Tryptona ..... 10 g  
NaCl ..... 10 g  
H<sub>2</sub>O destilada ..... csp. 1 L  
En caso de utilizar medio sólido adicionar 10% de agar bacteriológico.  
Ajustar pH y autoclavar

##### 5.4.5.2 L Broth

Extracto de levadura ..... 5 g  
Tryptona ..... 10 g  
NaCl ..... 5 g  
H<sub>2</sub>O destilada ..... csp. 1 L  
Ajustar pH y autoclavar

##### 5.4.5.3 Tryptone soy broth (TSB)

Tryptona ..... 17 g  
Dextrosa ..... 2,5 g  
NaCl ..... 5 g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 2,5 g  
H<sub>2</sub>O destilada ..... csp. 1 L  
En caso de utilizar medio sólido adicionar 10% de agar bacteriológico.  
Ajustar pH y autoclavar.

##### 5.4.5.4 MLiP

Tryptona ..... 5 g  
Extracto de carne ..... 3 g  
NaCl ..... 4 g  
H<sub>2</sub>O destilada ..... 900 mL  
Ajustar pH a 7 y agregar:  
    Aceite de oliva ..... 10 g  
    Lecitina de soja ..... 1 g  
    Agar bacteriológico ..... 15 g  
    H<sub>2</sub>O destilada ..... csp. 1 L

Autoclavar, termostatar a 60 °C, y agregar:

Rodamina B al 0,1% estéril ..... 5 mL

Agitar enérgicamente hasta lograr la completa disolución de la lecitina de soja.

#### 5.4.5.5 Yest extract Peptone Dextrose (YPD)

Extracto de levadura ..... 10 g

Peptona .....20 g

Dextrosa ..... 20 g

H<sub>2</sub>O destilada ..... csp. 1 L

En caso de utilizar medio sólido adicionar 10% de agar bacteriológico.

Ajustar pH y autoclavar.

#### 5.4.5.6 Synthetic Dextrose Minimal (SD)

Bases nitrogenadas sin aminoácidos ..... 6,7 g

Dextrosa ..... 20 g

Mezcla de aminoácidos ..... 1,3 g

Agar bacteriológico ..... 20 g

H<sub>2</sub>O destilada ..... csp. 1 L

Ajustar pH y autoclavar.

Mezcla de aminoácidos (<sup>1</sup>no deben ser incluidos en caso de utilizar un plásmido de selección por auxotrofia)

Aminoácido	Cantidad (g)
Sulfato de adenina	2,5
L-arginina (HCl)	1,2
L-ácido aspártico	6,0
L-ácido glutámico	6,0
L-histidina <sup>1</sup>	1,2
L-leucina <sup>1</sup>	3,6
L-lisina	1,8
L-metionina	1,2
L-fenilalanina	3,0
L-serina	22,5
L-treonina	12,0
L-triptófano <sup>1</sup>	2,4
L-tirosina	1,8
L-valina	9,0
Uracilo <sup>1</sup>	1,2

#### 5.4.5.7 Medio complejo con glicerol o metanol (BMGY o BMMY)

Extracto de levadura .....	10 g
Peptona .....	20 g
Buffer fosfato de potasio 1M, pH 6 .....	100 mL
Bases nitrogenadas .....	13,4 g
Glicerol 1 % o metanol 0,5%, en volumen	
H <sub>2</sub> O destilada .....	csp. 1 L

#### 5.4.5.8 Medio mínimo con glicerol o metanol (MGY o MM)

Preparar y esterilizar por filtración:

bases nitrogenadas al 13.4% (YNB 10x)

glicerol al 10% (Gli 10x)

metanol 5% (M 10x)

biotina al 0,02% (B 500X)

Mezclar en forma escéptica

H<sub>2</sub>O destilada estéril .....800 mL

YNB 10x ..... 100 mL

Gli 10x (MGY) o M 10x (MM) ..... 100 mL

B 500x ..... 20 mL

#### 5.4.5.9 Medio de autoinducción (AIM)

Medio NZY LB de autoinducción media NzyTech.

Los medios sólidos esterilizados, se termostataron a 60 °C y se repartieron en placas de Petri.

La triptona, el agar bacteriológico, la peptona, la triptona, el extracto de levadura, el extracto de carne, las bases nitrogenadas sin aminoácidos fueron adquiridos en la empresa Difco u Oxoid. La glucosa, el sorbitol, la biotina, los aminoácidos fueron adquiridos de Sigma. El metanol, el glicerol y las sales de potasio fueron adquiridos en la empresa Carlos Erba.



# Bibliografía

---



## Bibliografía

- Abe, R., Kudou, M., Tanaka, Y., Arakawa, T., & Tsumoto, K. (2009). Immobilized metal affinity chromatography in the presence of arginine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381(3), 306–310. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.01.054>
- Adamczyk, M., & Grote, J. (1996). Pseudomonas cepacia lipase mediated amidation of benzyl esters. *Tetrahedron Letters*, 37(44), 7913–7916. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(96\)01792-3](https://doi.org/10.1016/0040-4039(96)01792-3)
- Akanuma, S., Bessho, M., Kimura, H., Furukawa, R., Yokobori, S.-I., & Yamagishi, A. (2019). Establishment of mesophilic-like catalytic properties in a thermophilic enzyme without affecting its thermal stability. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45560-x>
- Al-Ghanayem, A. A., & Joseph, B. (2020). Current prospective in using cold-active enzymes as eco-friendly detergent additive. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10429-x>
- Amid, M., Asmadi, F. A., Hussin, M., Manap, M. Y., Islam Sarker, M. Z., & Hean, C. G. (2016). A novel aqueous micellar two-phase system composed of surfactant and mannitol for purification of polygalacturonase enzyme from *Durio zibethinus* Murray and recycling phase components. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 51(6), 968–975. <https://doi.org/10.1080/01496395.2016.1142562>
- Anastas, P. T., & Warner, J. C. (1999). Green Chemistry: Theory and Practice. *Science*, 284(5421), 1780–1780. Retrieved from <https://go.gale.com/ps/i.do?p=AONE&sw=w&issn=00368075&v=2.1&it=r&id=GALE%7CA55128369&sid=googleScholar&linkaccess=fulltext>
- Angajala, G., Pavan, P., & Subashini, R. (2016). Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 257–270. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.07.001>
- Arakawa, T., Ejima, D., Tsumoto, K., Obeyama, N., Tanaka, Y., Kita, Y., & Timasheff, S. N. (2007). Suppression of protein interactions by arginine: A proposed mechanism of the arginine effects. *Biophysical Chemistry*, 127(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2006.12.007>
- Arnold, F. H. (1998). Enzyme engineering reaches the boiling point. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), 2035–2036. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2035>
- Atomi, H., & Imanaka, T. (2004). Thermostable carboxylesterases from hyperthermophiles. *Tetrahedron Asymmetry*, 15(18), 2729–2735. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2004.07.054>

- Ayaz, B., Ugur, A., & Boran, R. (2015). Purification and characterization of organic solvent-tolerant lipase from *Streptomyces* sp. OC119-7 for biodiesel production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(1), 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.11.007>
- Baneyx, F., & Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1399–1407. <https://doi.org/10.1038/nbt1029>
- Bassegoda, A., Cesarini, S., & Diaz, P. (2012). Lipase improvement: Goals and strategies. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3), e201209005. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209005>
- Basso, A., & Serban, S. (2019). Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Molecular Catalysis*, 479(March), 110607. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>
- Baumgarten, T., Ytterberg, A. J., Zubarev, R. A., & de Gier, J. W. (2018). Optimizing recombinant protein production in the *Escherichia coli* periplasm alleviates stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(12). <https://doi.org/10.1128/AEM.00270-18>
- Baynes, B. M., Wang, D. I. C., & Trout, B. L. (2005). Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation. *Biochemistry*, 44(12), 4919–4925. <https://doi.org/10.1021/bi047528r>
- Bélafi-Bakó, K., Kovács, F., Gubicza, L., & Hancsók, J. (2002). Enzymatic biodiesel production from sunflower oil by *Candida antarctica* lipase in a solvent-free system. *Biocatalysis and Biotransformation*, 20(6), 437–439. <https://doi.org/10.1080/1024242021000040855>
- Benítez-Mateos, A. I., & Contente, M. L. (2021). Agarose vs. Methacrylate as material supports for enzyme immobilization and continuous processing. *Catalysts*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/catal11070814>
- Beyer, R. E. (1983). A rapid biuret assay for protein of whole fatty tissues. *Analytical Biochemistry*, 129(2), 483–485. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(83\)90580-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(83)90580-8)
- Bezborodov, A. M., & Zagustina, N. A. (2016). Enzymatic biocatalysis in chemical synthesis of pharmaceuticals (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 52(3), 237–249. <https://doi.org/10.1134/S0003683816030030>
- Bhosale, S. H., Rao, M. B., & Deshpande, V. V. (1996). Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiological Reviews*, 60(2), 280–300. <https://doi.org/10.1128/mnbr.60.2.280-300.1996>
- Bickerstaff, G. (1997). *Immobilization of enzymes and cells*. *Chemistry Bulletin / Huaxue Tongbao*. <https://doi.org/10.1385/0-89603-386-4:319>

- Bio-Sciences, G. H. (1995). Phast System. *Development*.
- Bisogno, T., Howell, F., Williams, G., Minassi, A., Cascio, M. G., Ligresti, A., ... Doherty, P. (2003). Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *Journal of Cell Biology*, *163*(3), 463–468. <https://doi.org/10.1083/jcb.200305129>
- Blanco, R. M., & Guisán, J. M. (1989). Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives. *Enzyme and Microbial Technology*, *11*(6), 360–366. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(89\)90020-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(89)90020-3)
- Boland, W., Frößl, C., & Lorenz, M. (1991). Esterolytic and lipolytic enzymes in organic synthesis. *Synthesis*, *1991*(12), 1049–1072.
- Bornscheuer, U. T. (2002). Microbial carboxyl esterases: Classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, *26*(1), 73–81. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(01\)00075-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(01)00075-4)
- Borrelli, G. M., & Trono, D. (2015). Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(9), 20774–20840. <https://doi.org/10.3390/ijms160920774>
- Buchner, J., Pastan, I., & Brinkmann, U. (1992). A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins: Single-chain immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies. *Analytical Biochemistry*, *205*(2), 263–270. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90433-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90433-8)
- Burgess, R. R. (2009). *Chapter 17 Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins. Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 463). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63017-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63017-2)
- Carvalho, A. C. L. D. M., Fonseca, T. D. S., De Mattos, M. C., De Oliveira, M. D. C. F., De Lemos, T. M. L. G., Molinari, F., ... Serra, I. (2015). Recent advances in lipase-mediated preparation of pharmaceuticals and their intermediates. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(12), 29682–29716. <https://doi.org/10.3390/ijms161226191>
- Castellanos-Mendoza, A., Castro-Acosta, R. M., Olvera, A., Zavala, G., Mendoza-Vera, M., García-Hernández, E., ... Valdez-Cruz, N. A. (2014). Influence of pH control in the formation of inclusion bodies during production of recombinant sphingomyelinase-D in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, *13*(1), 137. <https://doi.org/10.1186/preaccept-1104793932132453>
- Castilla, A., Panizza, P., Rodríguez, D., Bonino, L., Díaz, P., Irazoqui, G., & Rodríguez Giordano, S. (2017). A novel thermophilic and halophilic esterase from *Janibacter* sp. R02, the first member of a new lipase family (Family XVII). *Enzyme and Microbial Technology*, *98*(Family XVII), 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.12.010>

- Castilla, A., Rodriguez, S., & Irazoqui, Ga. (2021). *Microbial Extremozymes*. (M. Kuddus, Ed.), *Microbial Extremozymes*. Hail, Saudi Arabia: Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/c2019-0-04951-5>
- Cavalcante, F. T. T., Neto, F. S., Rafael de Aguiar Falcão, I., Erick da Silva Souza, J., de Moura Junior, L. S., da Silva Sousa, P., ... dos Santos, J. C. S. (2021). Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis. *Fuel*, 288(October). <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119577>
- Cedrés González, M. E. (2021). *Cedrés González, M. (2021.). Purificación y caracterización de lipasas de Geobacillus thermocatenulatus y de Pseudomonas fluorescens para su aplicación en reacciones de aminólisis. Tesis de grado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencia. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias. Retrieved from https://hdl.handle.net/20.500.12008/30639*
- Chandra, P., Enespa, Singh, R., & Arora, P. K. (2020). *Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. Microbial Cell Factories* (Vol. 19). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>
- Chatrenet, B., & Chang, J. Y. (1992). The folding of hirudin adopts a mechanism of trial and error. *Journal of Biological Chemistry*, 267(5), 3038–3043. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)50691-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)50691-3)
- Chen, C. K.-M., Lee, G.-C., Ko, T.-P., Guo, R.-T., Huang, L.-M., Liu, H.-J., ... Wang, A. H.-J. (2009). Structure of the Alkalohyperthermophilic *Archaeoglobus fulgidus* Lipase Contains a Unique C-Terminal Domain Essential for Long-Chain Substrate Binding. *Journal of Molecular Biology*, 390(4), 672–685. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.05.017>
- Chow, M. K. M., Amin, A. A., Fulton, K. F., Whisstock, J. C., Buckle, A. M., & Bottomley, S. P. (2006). REFOLD: An analytical database of protein refolding methods. *Protein Expression and Purification*, 46(1), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.07.022>
- Christopher, L. P., Hemanathan Kumar, & Zambare, V. P. (2014). Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *Applied Energy*, 119, 497–520. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.01.017>
- Chronopoulou, L., Sayalero, V. C., Rahimi, H., Ruggetti, A., & Palocci, C. (2021). Polymeric nanoparticles decorated with monoclonal antibodies: A new immobilization strategy for increasing lipase activity. *Catalysts*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/catal11060744>
- Clark, E. D. B. (2001). Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2), 202–207. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00200-7](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00200-7)
- Contesini, F. J., Davanço, M. G., Borin, G. P., Vanegas, K. G., Cirino, J. P. G., de Melo, R. R., ... Carvalho, P. de O. (2020). Advances in recombinant lipases: application in the

- pharmaceutical industry. *Industrial Biocatalysis: Challenges and Opportunities*, 10, 1–33. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2073-4344/10/9/1032/htm>
- Cos, O., Resina, D., Ferrer, P., Montesinos, J. L., & Valero, F. (2005). Heterologous production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 26(2–3), 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.04.005>
- Côté, A., & Shareck, F. (2008). Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Enzyme and Microbial Technology*, 42(5), 381–388. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.01.009>
- Cregg, J. M. (2007). Distinctions Between *Pichia pastoris* and Other Expression Systems. *Methods in Molecular Biology*, 389, 1–10. <https://doi.org/10.1385/1-59745-456-7:1>
- Dalmaso, G. Z. L., Ferreira, D., & Vermelho, A. B. (2015). Marine extremophiles a source of hydrolases for biotechnological applications. *Marine Drugs*, 13(4), 1925–1965. <https://doi.org/10.3390/md13041925>
- Daoud, L., Kamoun, J., Ali, M. B., Jallouli, R., Bradai, R., Mechichi, T., ... Aloulou, A. (2013). Purification and biochemical characterization of a halotolerant *Staphylococcus* sp. extracellular lipase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.018>
- Das, A. K., Bellizzi, J. J., Tandel, S., Biehl, E., Clardy, J., & Hofmann, S. L. (2000). Structural basis for the insensitivity of a serine enzyme (Palmitoyl-protein thioesterase) to phenylmethylsulfonyl fluoride. *Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 23847–23851. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002758200>
- Das, S., Noe, J. C., Paik, S., & Kitten, T. (2005). An improved arbitrary primed PCR method for rapid characterization of transposon insertion sites. *Journal of Microbiological Methods*, 63(1), 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.02.011>
- Das, U., Hariprasad, G., Ethayathulla, A. S., Manral, P., Das, T. K., Pasha, S., ... Srinivasan, A. (2007). Inhibition of protein aggregation: Supramolecular assemblies of Arginine hold the key. *PLoS ONE*, 2(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001176>
- Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>
- De Simone, G., Menchise, V., Manco, G., Mandrich, L., Sorrentino, N., Lang, D., ... Pedone, C. (2001). The crystal structure of a hyper-thermophilic carboxylesterase from the Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Journal of Molecular Biology*, 314(3), 507–518. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5152>
- Delgado-García, M., Rodríguez, J. A., Mateos-Díaz, J. C., Aguilar, C. N., Rodríguez-

- Herrera, R., & Camacho-Ruíz, R. M. (2018). Halophilic archaeal lipases and esterases: Activity, stability, and food applications. *Enzymes in Food Technology: Improvements and Innovations*, 243–262. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-1933-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1933-4_12)
- Deshpande, N., Wilkins, M. R., Packer, N., & Nevalainen, H. (2008). Protein glycosylation pathways in filamentous fungi. *Glycobiology*, 18(8), 626–637. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn044>
- Dewan, S. (2011). Enzymes in industrial applications: Global markets. *Market Research Report Wellesley, MA: BCC Research*.
- Dharmsthiti, S., Pratuangdejkul, J., Theeragool, G., & Luchai, S. (1998). Lipase activity and gene cloning of *Acinetobacter calcoaceticus* LP009. *Journal of General and Applied Microbiology*, 44(2), 139–145. <https://doi.org/10.2323/jgam.44.139>
- Dong, H., Li, J., Li, Y., Hu, L., & Luo, D. (2012). Improvement of catalytic activity and stability of lipase by immobilization on organobentonite. *Chemical Engineering Journal*, 181–182, 590–596. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.11.095>
- Donovan, R. S., Robinson, C. W., & Click, B. R. (1996). Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *Journal of Industrial Microbiology*, 16(3), 145–154. <https://doi.org/10.1007/BF01569997>
- Dossat, V., Combes, D., & Marty, A. (1999). Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: Influence of the glycerol production. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(3–5), 194–200. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00026-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00026-5)
- Dror, A., Kanteev, M., Kagan, I., Gihaz, S., Shahar, A., & Fishman, A. (2015). Structural insights into methanol-stable variants of lipase T6 from *Geobacillus stearothermophilus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(22), 9449–9461. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6700-4>
- Du, W., Xu, Y., & Liu, D. (2003). Lipase-catalysed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 38(2), 103. <https://doi.org/10.1042/ba20030032>
- Eichler, J., & Adams, M. W. W. (2005). Posttranslational Protein Modification in Archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(4), 696–696. <https://doi.org/10.1128/mnbr.69.4.696.2005>
- Ekman, R., & Holmbom, B. (2000). The chemistry of wood resin. In: Pitch Control, Wood Resin and Deresination. Eds. Back, EL, Allen, LH TAPPI, Atlanta, 67.
- El-Batal, A. I., Farrag, A. A., Elsayed, M. A., & El-Khawaga, A. M. (2016). Biodiesel production by *aspergillus Niger* lipase immobilized on barium ferrite magnetic nanoparticles. *Bioengineering*, 3(2).

<https://doi.org/10.3390/bioengineering3020014>

- El-Ghonemy, D. H., Ali, T. H., Hassanein, N. M., Abdellah, E. M., Fadel, M., Awad, G. E. A., & Abdou, D. A. M. (2021). Thermo-alkali-stable lipase from a novel *Aspergillus niger*: statistical optimization, enzyme purification, immobilization and its application in biodiesel production. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *51*(3), 225–240. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1805759>
- Ellaiah, P., Prabhakar, T., Ramakrishna, B., Thae Taleb, A., & Adinarayana, K. (2004). Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, *39*(5), 525–528. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00340-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00340-5)
- Evich, M., Stroeve, E., Zheng, Y. G., & Germann, M. W. (2016). Effect of methylation on the side-chain pKa value of arginine. *Protein Science*, *25*(2), 479–486. <https://doi.org/10.1002/pro.2838>
- Eyvazzadeh, N., Shakeri-Zadeh, A., Fekrazad, R., Amini, E., Ghaznavi, H., & Kamran Kamrava, S. (2017). Gold-coated magnetic nanoparticle as a nanotheranostic agent for magnetic resonance imaging and photothermal therapy of cancer. *Lasers in Medical Science*, *32*(7), 1469–1477. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2267-x>
- Faber, K. (2011). *Biocatalytic Applications Kurt Faber. Biotransformations in Organic Chemistry*. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-17393-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-17393-6_2)
- Facin, B. R., Melchior, M. S., Valério, A., Oliveira, J. V., & Oliveira, D. De. (2019). Driving Immobilized Lipases as Biocatalysts: 10 Years State of the Art and Future Prospects. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *58*(14), 5358–5378. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b00448>
- Falcochio, S., Ruiz, C., Pastor, F. I. J., Saso, L., & Diaz, P. (2005). Identification of a carboxylesterase-producing *Rhodococcus* soil isolate. *Canadian Journal of Microbiology*, *51*(9), 753–758. <https://doi.org/10.1139/W05-059>
- Fatima, S., Faryad, A., Ataa, A., Joyia, F. A., & Parvaiz, A. (2021). Microbial lipase production: A deep insight into the recent advances of lipase production and purification techniques. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *68*(3), 445–458. <https://doi.org/10.1002/bab.2019>
- Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C. M., Rodriguez, V., Santana, C., Soler, G., Bastida, A., & Guisán, J. M. (1993). Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme and Microbial Technology*, *15*(7), 546–550. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(93\)90016-U](https://doi.org/10.1016/0141-0229(93)90016-U)
- Fernández-Lorente, G., Ortiz, C., Segura, R. L., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M., & Palomo, J. M. (2005). Purification of different lipases from *Aspergillus niger* by using a highly selective adsorption on hydrophobic supports. *Biotechnology and Bioengineering*, *92*(6), 773–779. <https://doi.org/10.1002/bit.20656>

- Fields, P. A. (2001). Review: Protein function at thermal extremes: Balancing stability and flexibility. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 129(2–3), 417–431. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(00\)00359-7](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(00)00359-7)
- Filho, D. G., Silva, A. G., & Guidini, C. Z. (2019). Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(18), 7399–7423. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10027-6>
- Fischer, B., Sumner, I., & Goodenough, P. (1992). Isolation and renaturation of bio-active proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, 42(12), 1512–1515.
- Fitch, C. A., Platzer, G., Okon, M., Garcia-Moreno, B. E., & McIntosh, L. P. (2015). Arginine: Its pKa value revisited. *Protein Science*, 24(5), 752–761. <https://doi.org/10.1002/pro.2647>
- Fukimoto, J., Iwai, M., & Tsujisaka, Y. (1963). Studies on lipase purification and crystallization of a lipase secreted by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology*, 9(3), 353–361. Retrieved from [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam1955/9/3/9\\_3\\_353/\\_pdf/-char/ja](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam1955/9/3/9_3_353/_pdf/-char/ja)
- Futatsumori-Sugai, M., Abe, R., Watanabe, M., Kudou, M., Yamamoto, T., Ejima, D., ... Tsumoto, K. (2009). Utilization of Arg-elution method for FLAG-tag based chromatography. *Protein Expression and Purification*, 67(2), 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.03.012>
- Gao, S., Wang, Y., Diao, X., Luo, G., & Dai, Y. (2010). Effect of pore diameter and cross-linking method on the immobilization efficiency of *Candida rugosa* lipase in SBA-15. *Bioresource Technology*, 101(11), 3830–3837. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.023>
- García-Fruitós, E., Vázquez, E., Díez-Gil, C., Corchero, J. L., Seras-Franzoso, J., Ratera, I., ... Villaverde, A. (2012). Bacterial inclusion bodies: Making gold from waste. *Trends in Biotechnology*, 30(2), 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.09.003>
- GE Healthcare. (2006). Affinity chromatography-HiTrap Chelating High Performance, Instructions 71-7005-00 AX. Retrieved from [http://wolfson.huji.ac.il/expression/local/HiTrap\\_chelating.pdf](http://wolfson.huji.ac.il/expression/local/HiTrap_chelating.pdf)
- GenSmart Codon Optimization. (n.d.). Retrieved February 16, 2022, from <https://www.genscript.com/tools/gensmart-codon-optimization>
- Ghasemian, A., & Moradpour, Z. (2018). *Production of recombinant microbial thermostable lipases. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Genes Biochemistry and Applications*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63503-7.00008-5>
- Giacomini, C., Villarino, A., Franco-Fraguas, L., & Batista-Viera, F. (1998). Immobilization

- of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: Comparison of different methods. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 4(5–6), 313–327. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(98\)00071-X](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(98)00071-X)
- Gill, R. T., Valdes, J. J., & Bentley, W. E. (2000). A comparative study of global stress gene regulation in response to overexpression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 2(3), 178–189. <https://doi.org/10.1006/mben.2000.0148>
- Godoy, C. A., Rivas, B. D. Las, Grazú, V., Montes, T., Guisàn, J. M., & López-Gallego, F. (2011). Glyoxyl-disulfide agarose: A tailor-made support for site-directed rigidification of proteins. *Biomacromolecules*, 12(5), 1800–1809. <https://doi.org/10.1021/bm200161f>
- Gotor-Fernández, V., & Gotor, V. (2008). Aminolysis and Ammonolysis of Carboxylic Acid Derivatives. *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, 171–191. <https://doi.org/10.1002/9783527622481.ch7>
- Gowthami, P., Muthukumar, K., & Velan, M. (2015). Utilization of coconut oil cake for the production of lipase using *Bacillus coagulans* VKL. *Biocontrol Science*, 20(2), 125–133. <https://doi.org/10.4265/bio.20.125>
- Grazú, V., López-Gallego, F., Montes, T., Abian, O., González, R., Hermoso, J. A., ... Guisàn, J. M. (2010). Promotion of multipoint covalent immobilization through different regions of genetically modified penicillin G acylase from *E. coli*. *Process Biochemistry*, 45(3), 390–398. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.10.013>
- Guajardo, N., Ahumada, K., Domínguez de María, P., & Schrebler, R. A. (2019). Remarkable stability of *Candida antarctica* lipase B immobilized via cross-linking aggregates (CLEA) in deep eutectic solvents. *Biocatalysis and Biotransformation*, 37(2), 106–114. <https://doi.org/10.1080/10242422.2018.1492567>
- Gubbala, S., Nathani, H., Koizol, K., & Misra, R. D. K. (2004). Magnetic properties of nanocrystalline Ni-Zn, Zn-Mn, and Ni-Mn ferrites synthesized by reverse micelle technique. *Physica B: Condensed Matter*, 348(1–4), 317–328. <https://doi.org/10.1016/j.physb.2003.12.017>
- Gubin, S. P. (2009). *Magnetic nanoparticles*. John Wiley & Sons.
- 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>
- Guillén Schlippe, Y. V., & Hedstrom, L. (2005). A twisted base? The role of arginine in enzyme-catalyzed proton abstractions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433(1), 266–278. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.09.018>
- Guisan, J. M., Bolivar, J. M., López-Gallego, F., & Rocha-Martin, J. (2020). *Immobilization of enzymes and cells*. *Chemistry Bulletin / Huaxue Tongbao*.

<https://doi.org/10.1385/0-89603-386-4:319>

- Guisán, J. M., Penzol, G., Armisen, P., Bastida, A., Blanco, R. M., Fernandez-Lafuente, R., & García-Junceda, E. (2003). Immobilization of Enzymes Acting on Macromolecular Substrates: Reduction of Steric Problems. *Immobilization of Enzymes and Cells, I*, 261–276. <https://doi.org/10.1385/0-89603-386-4:261>
- Guldhe, A., Singh, P., Kumari, S., Rawat, I., Permaul, K., & Bux, F. (2016). Biodiesel synthesis from microalgae using immobilized *Aspergillus niger* whole cell lipase biocatalyst. *Renewable Energy*, 85, 1002–1010. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.07.059>
- Gupta, M. N., Kaloti, M., Kapoor, M., & Solanki, K. (2011). Nanomaterials as matrices for enzyme immobilization. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 39(2), 98–109. <https://doi.org/10.3109/10731199.2010.516259>
- Gupta, S. K., & Shukla, P. (2017). Microbial platform technology for recombinant antibody fragment production: A review. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(1), 31–42. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2016.1150959>
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/329121>
- Gutiérrez, A., Del Río, J. C., & Martínez, A. T. (2009). Microbial and enzymatic control of pitch in the pulp and paper industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(6), 1005–1018. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1905-z>
- Gutiérrez, A., del Río, J. C., & Martínez, Á. T. (2011). Fungi and Their Enzymes for Pitch Control in the Pulp and Paper Industry. *Industrial Applications*, 357–377. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-11458-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-642-11458-8_17)
- Harms, M. J., Schlessman, J. L., Sue, G. R., & Bertrand García-Moreno, E. (2011). Arginine residues at internal positions in a protein are always charged. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(47), 18954–18959. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104808108>
- Hassan, M. E., Yang, Q., Xiao, Z., Liu, L., Wang, N., Cui, X., & Yang, L. (2019). Impact of immobilization technology in industrial and pharmaceutical applications. *3 Biotech*, 9(12), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1969-0>
- He, C., & Ohnishi, K. (2017). Efficient renaturation of inclusion body proteins denatured by SDS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 490(4), 1250–1253. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.07.003>
- Healthcare, G. (2015). Hydrophobic Interaction and Reverse Phase Chromatography. *GE HealthCare Handbooks*.
- Healthcare, G. E. (n.d.). PD-10 Desalting Columns.

- Helwani, Z., Othman, M. R., Aziz, N., Fernando, W. J. N., & Kim, J. (2009). Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: A review. *Fuel Processing Technology*, *90*(12), 1502–1514. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2009.07.016>
- Henley, J. P., & Sadana, A. (1984). Series-type Enzyme Deactivation Kinetics: Influence of Immobilization, Chemical Modifiers, and Enzyme Aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *434*(1), 064–069. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1984.tb29801.x>
- Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., & Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: An update. *Journal of Chemical Biology*, *6*(4), 185–205. <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9>
- Hosu, O., Mirel, S., Săndulescu, R., & Cristea, C. (2019). Minireview: Smart tattoo, Microneedle, Point-Of-care, and Phone-Based Biosensors for Medical Screening, Diagnosis, and Monitoring. *Analytical Letters*, *52*(1), 78–92. <https://doi.org/10.1080/00032719.2017.1391826>
- Houde, A., Kademi, A., & Leblanc, D. (2004). Lipases and their industrial applications: An overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, *118*(1–3), 155–170. <https://doi.org/10.1385/ABAB:118:1-3:155>
- Invitrogen. (2010a). Pichia expression vectors for selection on Zeocin™ and purification of secreted, recombinant proteins. *Life Technologies*, (25), 48. Retrieved from [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha_man.pdf)
- Invitrogen. (2010b). User Manual pGAPZ A, B, and C pGAPZα A, B, and C Pichia expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins Catalog nos. V200-20 and V205-20, (25).
- Invitrogen. (2014). PichiaPink™ Yeast Expression System, 86. Retrieved from [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pichiapink\\_expression\\_system\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pichiapink_expression_system_man.pdf) <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/protein-biology/protein-expression/yeast-protein-expression/pichiapink-yeast-expression-systems.html>
- Irazoqui, G., Giacomini, C., Batista-Viera, F., & Brena, B. M. (2007). Hydrophilization of immobilized model enzymes suggests a widely applicable method for enhancing protein stability in polar organic co-solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *46*(1–4), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.02.005>
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M., & Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, *15*(1), 29–63. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(94\)90025-6](https://doi.org/10.1016/0168-6445(94)90025-6)
- Jaeger, K. E., & Reetz, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, *16*(9), 396–403. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01195-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01195-0)

- Janson, J.-C. (2012). *Protein purification: principles, high resolution methods, and applications*. John Wiley & Sons.
- Jemli, S., Ayadi-Zouari, D., Hlima, H. Ben, & Bejar, S. (2016). Biocatalysts: Application and engineering for industrial purposes. *Critical Reviews in Biotechnology*, *36*(2), 246–258. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.950550>
- Jen, W. S., Wiener, J. J. M., & MacMillan, D. W. C. (2000). New strategies for organic catalysis: The first enantioselective organocatalytic 1,3-dipolar cycloaddition [20]. *Journal of the American Chemical Society*, *122*(40), 9874–9875. <https://doi.org/10.1021/ja005517p>
- Jeong, S. T., Kim, H. K., Kim, S. J., Chi, S. W., Pan, J. G., Oh, T. K., & Ryu, S. E. (2002). Novel zinc-binding center and a temperature switch in the *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(19), 17041–17047. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200640200>
- Jia, H., Zhu, G., Vugrinovich, B., Kataphinan, W., Reneker, D. H., & Wang, P. (2002). Enzyme-carrying polymeric nanofibers prepared via electrospinning for use as unique biocatalysts. *Biotechnology Progress*, *18*(5), 1027–1032. <https://doi.org/10.1021/bp020042m>
- Johnson, P. A., Park, H. J., & Driscoll, A. J. (2011). Enzyme nanoparticle fabrication: magnetic nanoparticle synthesis and enzyme immobilization. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *679*(1), 183–191. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-895-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-895-9_15)
- Joseph, B., Ramteke, P. W., & Thomas, G. (2008). Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. *Biotechnology Advances*, *26*(5), 457–470. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.05.003>
- Jung, H., & Moon, S. J. (2013). Purification, distribution, and characterization activity of lipase from oat seeds (*Avena sativa* L.). *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, *56*(6), 639–645. <https://doi.org/10.1007/s13765-013-3119-4>
- Kaboudin, B., Khanmohammadi, H., & Kazemi, F. (2017). Polymer supported gold nanoparticles: Synthesis and characterization of functionalized polystyrene-supported gold nanoparticles and their application in catalytic oxidation of alcohols in water. *Applied Surface Science*, *425*, 400–406. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.07.033>
- Kanmani, P., Kumaresan, K., & Aravind, J. (2015). Utilization of coconut oil mill waste as a substrate for optimized lipase production, oil biodegradation and enzyme purification studies in *Staphylococcus pasteurii*. *Electronic Journal of Biotechnology*, *18*(1), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.11.003>
- Katoh, S., & Katoh, Y. (2000). Continuous refolding of lysozyme with fed-batch addition of denatured protein solution. *Process Biochemistry*, *35*(10), 1119–1124. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00145-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00145-X)

- Kazlauskas, R. J., & Bornscheuer, U. T. (2008). Biotransformations with Lipases. *Biotechnology: Second, Completely Revised Edition*, 8–12, 37–191. <https://doi.org/10.1002/9783527620999.ch3h>
- Khan, F. I., Lan, D., Durrani, R., Huan, W., Zhao, Z., & Wang, Y. (2017). The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 5(MAR), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00016>
- Kim, J., Grate, J. W., & Wang, P. (2006). Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science*, 61(3), 1017–1026. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2005.05.067>
- Kim, J., Grate, J. W., & Wang, P. (2008). Nanobiocatalysis and its potential applications. *Trends in Biotechnology*, 26(11), 639–646. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.07.009>
- Kim, J., Jia, H., & Wang, P. (2006). Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells. *Biotechnology Advances*, 24(3), 296–308. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.11.006>
- Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., & Ulrich Hartl, F. (2013). *Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. Annual Review of Biochemistry* (Vol. 82). <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-092442>
- Kimple, M. E., Brill, A. L., & Pasker, R. L. (2013). Overview of affinity tags for protein purification. *Current Protocols in Protein Science*, (SUPPL.73), 1–23. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0909s73>
- Kouker, G., & Jaeger, K. E. (1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(1), 211–213. <https://doi.org/10.1128/aem.53.1.211-213.1987>
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., & Peterson, K. M. (1995). <http://www-ab.informatik.uni-tuebingen.de/software\rFour> new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166(1), 175–176. Retrieved from <http://www-ab.informatik.uni-tuebingen.de/toolbox/index.php?view=domainpred>
- Krachmarova, E., Ivanov, I., & Nacheva, G. (2020). Nucleic acids in inclusion bodies obtained from E. coli cells expressing human interferon-gamma. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01400-6>
- Kumar, R., Goomber, S., & Kaur, J. (2019). Engineering lipases for temperature adaptation: Structure function correlation. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1867(11), 140261. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.08.001>
- Leung, D. Y. C., Wu, X., & Leung, M. K. H. (2010). A review on biodiesel production using

catalyzed transesterification. *Applied Energy*, 87(4), 1083–1095. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.10.006>

Lewkowicz, E. (2011). *Biocatalizadores: del laboratorio a la industria*.

Li, M., Yang, L. R., Xu, G., & Wu, J. P. (2013). Screening, purification and characterization of a novel cold-active and organic solvent-tolerant lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* CGMCC 4254. *Bioresource Technology*, 148, 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.101>

Li, P. Y., Zhang, Y. Q., Zhang, Y., Jiang, W. X., Wang, Y. J., Zhang, Y. S., ... Chen, X. L. (2020). Study on a Novel Cold-Active and Halotolerant Monoacylglycerol Lipase Widespread in Marine Bacteria Reveals a New Group of Bacterial Monoacylglycerol Lipases Containing Unusual C(A/S)HSMG Catalytic Motifs. *Frontiers in Microbiology*, 11(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00009>

Li, X. J., Zheng, R. C., Ma, H. Y., & Zheng, Y. G. (2014). Engineering of *Thermomyces lanuginosus* lipase Lip: Creation of novel biocatalyst for efficient biosynthesis of chiral intermediate of Pregabalin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(6), 2473–2483. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5136-y>

Lilie, H., Schwarz, E., & Rudolph, R. (1998). Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 9(5), 497–501. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(98\)80035-9](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(98)80035-9)

List, B., Lerner, R. A., & Barbas, C. F. (2000). Proline-catalyzed direct asymmetric aldol reactions [13]. *Journal of the American Chemical Society*, 122(10), 2395–2396. <https://doi.org/10.1021/ja994280y>

List, B., & Yang, J. W. (2006). The organic approach to asymmetric catalysis. *Science*, 313(5793), 1584–1586. <https://doi.org/10.1126/science.1131945>

López-Gallego, F., Acebrón, I., Mancheño, J. M., Raja, S., Lillo, M. P., & Guisán Seijas, J. M. (2012). Directed, strong, and reversible immobilization of proteins tagged with a  $\beta$ -trefoil lectin domain: A simple method to immobilize biomolecules on plain agarose matrixes. *Bioconjugate Chemistry*, 23(3), 565–573. <https://doi.org/10.1021/bc2006237>

López-López, O., Cerdán, M. E., & González Siso, M. I. (2014). New Extremophilic Lipases and Esterases from Metagenomics, 445–455. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4093774/pdf/CPPS-15-445.pdf>

Lotti, M., Pleiss, J., Valero, F., & Ferrer, P. (2015). Effects of methanol on lipases: Molecular, kinetic and process issues in the production of biodiesel. *Biotechnology Journal*, 10(1), 22–30. <https://doi.org/10.1002/biot.201400158>

Lousa, D., Baptista, A. M., & Soares, C. M. (2012). Analyzing the molecular basis of enzyme stability in ethanol/water mixtures using molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(2), 465–473.

<https://doi.org/10.1021/ci200455z>

Luetz, S., Giver, L., & Lalonde, J. (2008). Engineered enzymes for chemical production. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(4), 647–653. <https://doi.org/10.1002/bit.22077>

Mahyon, N. I., Zulkifli, N. I., Kamal, N. M., Salleh, A. B., & Oslan, S. N. (2018). Thermostable lipase from pichia sp. Strain RT: Identification, production and characterization. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 26(1), 19–28. <https://doi.org/10.35118/apjmbb.2018.026.1.03>

Makhlynets, O. V., & Korendovych, I. V. (2019). A single amino acid enzyme. *Nature Catalysis*, 2(11), 949–950. <https://doi.org/10.1038/s41929-019-0379-3>

Mandal, B. (2021). A brief introduction to Green Chemistry. *Chemistry & Biology Interface*, 11(4).

Manjrekar, S., Wadekar, T., & Sumant, O. (2021). Enzymes Market Size & Industry Forecast by 2027. Retrieved February 15, 2022, from <https://www.alliedmarketresearch.com/enzymes-market>

Manta, B., Boyd, D., & Berkmen, M. (2019). Disulfide Bond Formation in the Periplasm of Escherichia coli. *EcoSal Plus*, 8(2). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0012-2018>

Markets and Markets. (2015). Lipase Market by Application, Source, Geography – 2020 | MarketsandMarkets. Retrieved February 15, 2022, from <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/lipase-market-205981206.html>

Masomian, M., Rahman, R. N. Z. R. A., & Salleh, A. B. (2018). A novel method of affinity tag cleavage in the purification of a recombinant thermostable lipase from Aneurinibacillus thermoaerophilus strain HZ. *Catalysts*, 8(10), 1–23. <https://doi.org/10.3390/catal8100479>

Mateo, C., Palomo, J. M., Fuentes, M., Betancor, L., Grazu, V., López-Gallego, F., ... Guisán, J. M. (2006). Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.014>

Mathiazakan, P., Shing, S. Y., Ying, S. S., Kek, H. K., Tang, M. S. Y., Show, P. L., ... Ling, T. C. (2016). Pilot-scale aqueous two-phase floatation for direct recovery of lipase derived from Burkholderia cepacia strain ST8. *Separation and Purification Technology*, 171, 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.07.017>

Matsuura, S. ichi, Ishii, R., Itoh, T., Hamakawa, S., Tsunoda, T., Hanaoka, T., & Mizukami, F. (2011). Immobilization of enzyme-encapsulated nanoporous material in a microreactor and reaction analysis. *Chemical Engineering Journal*, 167(2–3), 744–749. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.10.042>

- Mehta, A., Bodh, U., & Gupta, R. (2017). Fungal lipases: A review. *Journal of Biotech Research*, 8(1), 58–77.
- Melani, N. B., Tambourgi, E. B., & Silveira, E. (2020). Lipases: From Production to Applications. *Separation and Purification Reviews*, 49(2), 143–158. <https://doi.org/10.1080/15422119.2018.1564328>
- Mhetras, N. C., Bastawde, K. B., & Gokhale, D. V. (2009). Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresource Technology*, 100(3), 1486–1490. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.016>
- Misawa, S. (1999). Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies - Misawa - 2000 - Peptide Science - Wiley Online Library. *Peptide Science*. Retrieved from [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(1999\)51:4%3C297::AID-BIP5%3E3.0.CO%5Cn2-l/abstract%5Cnpapers2://publication/uuid/27B5244A-2153-4F27-B0A1-F4C68CC35342](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0282(1999)51:4%3C297::AID-BIP5%3E3.0.CO%5Cn2-l/abstract%5Cnpapers2://publication/uuid/27B5244A-2153-4F27-B0A1-F4C68CC35342)
- Misra, R. D. K., Gubbala, S., Kale, A., & Egelhoff, W. F. (2004). A comparison of the magnetic characteristics of nanocrystalline nickel, zinc, and manganese ferrites synthesized by reverse micelle technique. *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology*, 111(2–3), 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2004.04.014>
- Mizutani, H., Sugawara, H., Buckle, A. M., Sangawa, T., Miyazono, K. I., Ohtsuka, J., ... Yura, K. (2017). REFOLDdb: A new and sustainable gateway to experimental protocols for protein refolding. *BMC Structural Biology*, 17(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12900-017-0074-z>
- Mody, V. V., Singh, A., & Wesley, B. (2013). Basics of magnetic nanoparticles for their application in the field of magnetic fluid hyperthermia. *European Journal of Nanomedicine*, 5(1), 11–21. <https://doi.org/10.1515/ejnm-2012-0008>
- Moura, M. V. H., de Andrade, R. A., Dobler, L., de Godoy Daiha, K., Brêda, G. C., AnoBom, C. D., & Almeida, R. V. (2017). Extremophilic Lipases. In *Extremophilic Enzymatic Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Bioenergy* (pp. 249–270). Springer.
- Movassaghi, M., & Jacobsen, E. N. (2002). Chemistry: The simplest “enzyme.” *Science*, 298(5600), 1904–1905. <https://doi.org/10.1126/science.1076547>
- Naganthran, A., Masomian, M., Rahman, R. N. Z. R. A., Ali, M. S. M., & Nooh, H. M. (2017). Improving the efficiency of new automatic dishwashing detergent formulation by addition of thermostable lipase, protease and amylase. *Molecules*, 22(9), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules22091577>
- Nandi, C. L., Singh, J., & Thornton, J. M. (1993). Atomic environments of arginine side chains in proteins. *Protein Engineering, Design and Selection*, 6(3), 247–259. <https://doi.org/10.1093/protein/6.3.247>

- Nandini, K. E., & Rastogi, N. K. (2009). Reverse micellar extraction for downstream processing of lipase: Effect of various parameters on extraction. *Process Biochemistry*, *44*(10), 1172–1178. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.06.020>
- Nanssou Kouteu, P. A., Baréa, B., Barouh, N., Blin, J., & Villeneuve, P. (2016). Lipase Activity of Tropical Oilseed Plants for Ethyl Biodiesel Synthesis and Their Typo- and Regioselectivity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(46), 8838–8847. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03674>
- Nardini, M., & Dijkstra, B. W. (1999).  $\alpha/\beta$  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)
- Nelson, L. A., Foglia, T. A., & Marmer, W. N. (1996). Lipase-catalyzed production of biodiesel. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, *73*(9), 1191–1195. <https://doi.org/10.1007/BF02523383>
- Nerurkar, M., Joshi, M., Pariti, S., & Adivarekar, R. (2013). Application of lipase from marine bacteria *Bacillus sonorensis* as an additive in detergent formulation. *Journal of Surfactants and Detergents*, *16*(3), 435–443. <https://doi.org/10.1007/s11743-012-1434-0>
- Nielsen, P. M., Brask, J., & Fjerbaek, L. (2008). Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *110*(8), 692–700. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800064>
- Nigam, P. S. (2013). Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules*, *3*(3), 597–611. <https://doi.org/10.3390/biom3030597>
- Nikolić, M. P., Srdić, V. V., & Antov, M. G. (2009). Immobilization of lipase into mesoporous silica particles by physical adsorption. *Biocatalysis and Biotransformation*, *27*(4), 254–262. <https://doi.org/10.1080/10242420903049895>
- Niyonzima, F. N., & More, S. S. (2015). Microbial detergent compatible lipases. *Journal of Scientific and Industrial Research*, *74*(2), 105–113.
- Northrup, A. B., & MacMillan, D. W. C. (2002). The first direct and enantioselective cross-aldol reaction of aldehydes. *Journal of the American Chemical Society*, *124*(24), 6798–6799. <https://doi.org/10.1021/ja0262378>
- Noureddini, H., Gao, X., & Philkana, R. S. (2005). Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresource Technology*, *96*(7), 769–777. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.05.029>
- Nurul Furqan, B. R., & Akhmaloka. (2020). Heterologous expression and characterization of thermostable lipase (Lk1) in *Pichia pastoris* GS115. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *23*(November 2019), 101448. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101448>

- Oliveira, F., Moreira, C., Salgado, J. M., Abrunhosa, L., Venâncio, A., & Belo, I. (2016). Olive pomace valorization by *Aspergillus* species: lipase production using solid-state fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *96*(10), 3583–3589. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7544>
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Sybille, M., ... Goldman, A. (1992). The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Protein Engineering, Design and Selection*, *5*(3), 197–211. <https://doi.org/10.1093/protein/5.3.197>
- Olsen, H. S., & Falholt, P. (1998). The role of enzymes in modern detergency. *Journal of Surfactants and Detergents*, *1*(4), 555–567. <https://doi.org/10.1007/s11743-998-0058-7>
- Olsen, O., & Thomsen, K. K. (1991). Improvement of bacterial  $\beta$ -glucanase thermostability by glycosylation. *Journal of General Microbiology*, *137*(3), 579–585. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-3-579>
- Orrego, A. H., Romero-Fernández, M., Millán-Linares, M. D. C., Yust, M. D. M., Guisán, J. M., & Rocha-Martin, J. (2018). Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment on aldehyde-supports: 2-picoline borane as an alternative reducing agent. *Catalysts*, *8*(8). <https://doi.org/10.3390/catal8080333>
- Ovejero, J. G., Armenia, I., Serantes, D., Veintemillas-Verdaguer, S., Zeballos, N., López-Gallego, F., ... Grazu, V. (2021). Selective Magnetic Nanoheating: Combining Iron Oxide Nanoparticles for Multi-Hot-Spot Induction and Sequential Regulation. *Nano Letters*, *21*(17), 7213–7220. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.1c02178>
- Pandey, N., Dhakar, K., Jain, R., & Pandey, A. (2016). Temperature dependent lipase production from cold and pH tolerant species of *Penicillium*. *Mycosphere*, *7*(10), 1533–1545. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/si/3b/5>
- 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>
- Panizza Scasso, A. P. (2013). Evaluación y optimización de las propiedades bioquímicas, genéticas y moleculares de las lipasas de *Pseudomonas* y prospección de nuevas enzimas lipolíticas para biocatálisis.
- Park, H. J., Joo, J. C., Park, K., & Yoo, Y. J. (2012). Stabilization of *Candida antarctica* lipase B in hydrophilic organic solvent by rational design of hydrogen bond. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *17*(4), 722–728. <https://doi.org/10.1007/s12257-012-0092-4>
- Pavlidis, I. V., Vorhaben, T., Gournis, D., Papadopoulos, G. K., Bornscheuer, U. T., & Stamatis, H. (2012). Regulation of catalytic behaviour of hydrolases through interactions with functionalized carbon-based nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research*, *14*(5). <https://doi.org/10.1007/s11051-012-0842-4>

- Pawar, S. P., Dhotre, D. P., Shetty, S. A., Chowdhury, S. P., Chaudhar, B. L., & Shouche, Y. S. (2012). Genome sequence of *Janibacter hoylei* MTCC8307, isolated from the stratospheric air. *Journal of Bacteriology*, *194*(23), 6629–6630. <https://doi.org/10.1128/JB.01728-12>
- Pera, L. M., Romero, C. M., Baigori, M. D., & Castro, G. R. (2006). Catalytic properties of lipase extracts from *Aspergillus niger*. *Food Technology and Biotechnology*, *44*(2), 247–252.
- Pérez, D., Kovačić, F., Wilhelm, S., Jaeger, K. E., García, M. T., Ventosa, A., & Mellado, E. (2012). Identification of amino acids involved in the hydrolytic activity of lipase LipBL from *Marinobacter lipolyticus*. *Microbiology (United Kingdom)*, *158*(8), 2192–2203. <https://doi.org/10.1099/mic.0.058792-0>
- Pérez, D., Martín, S., Fernández-Lorente, G., Filice, M., Guisán, J. M., Ventosa, A., ... Mellado, E. (2011). A novel halophilic lipase, LipBL, showing high efficiency in the production of eicosapentaenoic acid (EPA). *PLoS ONE*, *6*(8), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023325>
- Pérido, E. A., Hemery, G., Sandre, O., Ortega, D., Garaio, E., Plazaola, F., & Teran, F. J. (2015). Fundamentals and advances in magnetic hyperthermia. *Applied Physics Reviews*, *2*(4). <https://doi.org/10.1063/1.4935688>
- Peternel, Š. (2013). Bacterial cell disruption: A crucial step in protein production. *New Biotechnology*, *30*(2), 250–254. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.09.005>
- Poppe, J. K., Fernandez-Lafuente, R., Rodrigues, R. C., & Ayub, M. A. Z. (2015). Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. *Biotechnology Advances*, *33*(5), 511–525. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.011>
- Priyanka, P., Tan, Y., Kinsella, G. K., Henehan, G. T., & Ryan, B. J. (2019). Solvent stable microbial lipases: current understanding and biotechnological applications. *Biotechnology Letters*, *41*(2), 203–220. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-02633-7>
- pUC57 plasmid DNA - GenScript. (n.d.). Retrieved February 18, 2022, from [https://www.genscript.com/vector/SD1176-pUC57\\_plasmid\\_DNA.html](https://www.genscript.com/vector/SD1176-pUC57_plasmid_DNA.html)
- Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., Neifar, M., & Fava, F. (2015). Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(19), 7907–7913. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6874-9>
- Rajendran, A., Thirugnanam, M., & Thangavelu, V. (2007). Statistical evaluation of medium components by Plackett-Burman experimental design and kinetic modeling of lipase production by *Pseudomonas fluorescens*. *Indian Journal of Biotechnology*, *6*(4), 469–478.
- Ramnath, L., Sithole, B., & Govinden, R. (2017). Identification of lipolytic enzymes

- isolated from bacteria indigenous to Eucalyptus wood species for application in the pulping industry. *Biotechnology Reports*, 15, 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.07.004>
- Rathi, P., Bradoo, S., Saxena, R. K., & Gupta, R. (2000). A hyper-thermostable, alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. with the property of thermal activation. *Biotechnology Letters*, 22(6), 495–498. <https://doi.org/10.1023/A:1005604617440>
- Reetz, M. T. (2016a). *Directed Evolution of Selective Enzymes: Catalysts for Organic Chemistry and Biotechnology*. London: Wiley Blackwell.
- Reetz, M. T. (2016b). What are the Limitations of Enzymes in Synthetic Organic Chemistry? *Chemical Record*, 16(6), 2449–2459. <https://doi.org/10.1002/tcr.201600040>
- Reetz, M. T., Soni, P., Fernández, L., Gumulya, Y., & Carballeira, J. D. J. D. (2010). Increasing the stability of an enzyme toward hostile organic solvents by directed evolution based on iterative saturation mutagenesis using the B-FIT method. *Chemical Communications*, 46(45), 8657–8658. <https://doi.org/10.1039/c0cc02657c>
- Regenhardt, D., Heuer, H., Heim, S., Fernandez, D. U., Strömpl, C., Moore, E. R. B., & Timmis, K. N. (2002). Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environmental Microbiology*, 4(12), 912–915. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00368.x>
- Restrepo-Pineda, S., Bando-Campos, C. G., Valdez-Cruz, N. A., & Trujillo-Roldán, M. A. (2019). Recombinant production of ESAT-6 antigen in thermoinducible *Escherichia coli*: the role of culture scale and temperature on metabolic response, expression of chaperones, and architecture of inclusion bodies. *Cell Stress and Chaperones*, 24(4), 777–792. <https://doi.org/10.1007/s12192-019-01006-x>
- Rinas, U., & Bailey, J. E. (1992). Protein compositional analysis of inclusion bodies produced in recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(5), 609–614. <https://doi.org/10.1007/BF00240735>
- Rivera-Pérez, C., del Toro, M. de los Á. N., & García-Carreño, F. (2011). Purification and characterization of an intracellular lipase from pleopods of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 158(1), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.10.004>
- Riyadi, F. A., Alam, M. Z., Salleh, M. N., & Salleh, H. M. (2017). Optimization of thermostable organic solvent-tolerant lipase production by thermotolerant *Rhizopus* sp. using solid-state fermentation of palm kernel cake. *3 Biotech*, 7(5), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0932-1>
- Robinson, P. J., Pringle, M. A., Woolhead, C. A., & Bulleid, N. J. (2017). Folding of a single domain protein entering the endoplasmic reticulum precedes disulfide formation.

*Journal of Biological Chemistry*, 292(17), 6978–6986.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M117.780742>

- Rodrigues, R. C., Berenguer-Murcia, Á., Carballares, D., Morellon-Sterling, R., & Fernandez-Lafuente, R. (2021). Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other stabilization strategies. *Biotechnology Advances*, 52(August). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107821>
- Rohan. (2017). Lipase Market worth \$590.5 Million by 2020. *Markets & Markets*, 2018–2020. Retrieved from <https://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/lipase.asp>
- Romero-Fernández, M., & Paradisi, F. (2020). Protein immobilization technology for flow biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 55, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.11.008>
- Romero, C. M., Pera, L. M., Loto, F., Vallejos, C., Castro, G., & Baigori, M. D. (2012). Purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Aspergillus niger* MYA 135 and its application in ester synthesis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(1), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2011.08.013>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(APR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Roy, D., & Sengupta, S. (2007). Structural features of a cold-adapted alaskan bacterial lipase. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 24(5), 463–470. <https://doi.org/10.1080/07391102.2007.10507134>
- Rudolph, R., & Martin-luther-universitdt, H. L. (2018). In vitro folding, 49–56.
- Ryan, B. J., & Ó'Fágáin, C. (2007). Arginine-to-lysine substitutions influence recombinant horseradish peroxidase stability and immobilisation effectiveness. *BMC Biotechnology*, 7, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-86>
- Saeki, K., Ozaki, K., Kobayashi, T., & Ito, S. (2007). Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103(6), 501–508. <https://doi.org/10.1263/jbb.103.501>
- Sahay, S., & Chouhan, D. (2018). Study on the potential of cold-active lipases from psychrotrophic fungi for detergent formulation. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.04.006>
- Sakaguchi, K., Matsui, M., & Mizukami, F. (2005). Applications of zeolite inorganic composites in biotechnology: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(3), 306–311. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1782-4>
- Salameh, M. A., & Wiegel, J. (2010). Effects of Detergents on Activity, Thermostability and Aggregation of Two Alkalithermophilic Lipases from *Thermosyntropha*

- lipolytica. *The Open Biochemistry Journal*, 4, 22–28. <https://doi.org/10.2174/1874091x01004010022>
- San-Miguel, T., Pérez-Bermúdez, P., & Gavidia, I. (2013). Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in *E. coli* is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature. *SpringerPlus*, 2(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-89>
- Sangeetha, R., Geetha, A., & Arulpandi, I. (2010). Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* VSG1: Production, purification and characterization. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(1), 179–185. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000100026>
- Sarkar, P., Yamasaki, S., Basak, S., Bera, A., & Bag, P. K. (2012). Purification and characterization of a new alkali-thermostable lipase from *Staphylococcus aureus* isolated from *Arachis hypogaea* rhizosphere. *Process Biochemistry*, 47(5), 858–866. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.02.023>
- Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V., & Sumana, C. (2018). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology Progress*, 34(1), 5–28. <https://doi.org/10.1002/btpr.2581>
- Schein, C. H., & Noteborn, M. H. M. (1988). Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Nature Biotechnology*, 6, 291–294.
- Scherer, R. (2014). Blue Sun touts breakthrough in biodiesel industry. St. Joseph: St. Joseph News-Press.
- Schmid-Dannert, C., & López-Gallego, F. (2019). Advances and opportunities for the design of self-sufficient and spatially organized cell-free biocatalytic systems. *Current Opinion in Chemical Biology*, 49, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.11.021>
- 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)
- Sepharose, N., Performance, H., Sepharose, N., Performance, H., & Hp, H. (n.d.). HisTrap HP, 1 ml and 5 ml, 1–20.
- Serra, E., Mayoral, Á., Sakamoto, Y., Blanco, R. M., & Díaz, I. (2008). Immobilization of lipase in ordered mesoporous materials: Effect of textural and structural parameters. *Microporous and Mesoporous Materials*, 114(1–3), 201–213. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.01.005>
- Sethi, B. K., Nanda, P. K., & Sahoo, S. (2016). Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10.

- Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 143–149.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.026>
- Sharma, A. K., Sharma, V., & Saxena, J. (2016). A Review on Properties of Fungal Lipases. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(12), 123–130.  
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.512.014>
- Sharma, S., Vaid, S., Bhat, B., Singh, S., & Bajaj, B. K. (2019). *Thermostable Enzymes for Industrial Biotechnology. Advances in Enzyme Technology*. Elsevier B.V.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64114-4.00017-0>
- Shehata, M., Timucin, E., Venturini, A., & Sezerman, O. U. (2020). Understanding thermal and organic solvent stability of thermoalkalophilic lipases: insights from computational predictions and experiments. *Journal of Molecular Modeling*, 26(6).  
<https://doi.org/10.1007/s00894-020-04396-3>
- Sheldon, R. A. (2007). Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 349(8–9), 1289–1307.  
<https://doi.org/10.1002/adsc.200700082>
- Sheldon, R. A., Basso, A., & Brady, D. (2021). New frontiers in enzyme immobilisation: Robust biocatalysts for a circular bio-based economy. *Chemical Society Reviews*, 50(10), 5850–5862. <https://doi.org/10.1039/d1cs00015b>
- Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223–6235.  
<https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>
- Show, P. L., Tan, C. P., Shamsul Anuar, M., Ariff, A., Yusof, Y. A., Chen, S. K., & Ling, T. C. (2012). Extractive fermentation for improved production and recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* using a thermoseparating polymer in aqueous two-phase systems. *Bioresource Technology*, 116, 226–233.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.131>
- SHU, Z. Y., YANG, J. K., & YAN, Y. J. (2007). Purification and Characterization of a Lipase from *Aspergillus niger* F044. *Chinese Journal of Biotechnology*, 23(1), 96–101.  
[https://doi.org/10.1016/S1872-2075\(07\)60007-7](https://doi.org/10.1016/S1872-2075(07)60007-7)
- Sikorski, R. S., & Hieter, P. (1989). *A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in Saccharomyces cerevisiae*. Retrieved from <https://academic.oup.com/genetics/article/122/1/19/5998076>
- Singh, A. K., & Mukhopadhyay, M. (2012). Overview of fungal lipase: A review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(2), 486–520.  
<https://doi.org/10.1007/s12010-011-9444-3>
- Singh, R. K., Tiwari, M. K., Singh, R., & Lee, J. K. (2013). From protein engineering to immobilization: Promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), 1232–1277.

<https://doi.org/10.3390/ijms14011232>

- Singh, R. R., & Appu Rao, A. G. (2002). Reductive unfolding and oxidative refolding of a Bowman-Birk inhibitor from horsegram seeds (*Dolichos biflorus*): Evidence for “hyperreactive” disulfide bonds and rate-limiting nature of disulfide isomerization in folding. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1597(2), 280–291. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(02\)00301-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(02)00301-1)
- Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(4), 303–310. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.303>
- Singhvi, P., Saneja, A., Srichandan, S., & Panda, A. K. (2020). Bacterial Inclusion Bodies: A Treasure Trove of Bioactive Proteins. *Trends in Biotechnology*, 38(5), 474–486. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.011>
- Skumiel, A., Kaczmarek-Klinowska, M., Timko, M., Molcan, M., & Rajnak, M. (2013). Evaluation of power heat losses in multidomain iron particles under the influence of AC magnetic field in RF range. *International Journal of Thermophysics*, 34(4), 655–666. <https://doi.org/10.1007/s10765-012-1380-0>
- Slouka, C., Kopp, J., Spadiut, O., & Herwig, C. (2019). Perspectives of inclusion bodies for bio-based products: curse or blessing? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(3), 1143–1153. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9569-1>
- Song, Y. S., Shin, H. Y., Lee, J. Y., Park, C., & Kim, S. W. (2012).  $\beta$ -Galactosidase-immobilised microreactor fabricated using a novel technique for enzyme immobilisation and its application for continuous synthesis of lactulose. *Food Chemistry*, 133(3), 611–617. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.096>
- Soumanou, M. M., & Bornscheuer, U. T. (2003). Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(1), 97–103. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00090-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00090-5)
- Steele, H. L., Jaeger, K. E., Daniel, R., & Streit, W. R. (2008). Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenomes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16(1–2), 25–37. <https://doi.org/10.1159/000142892>
- Subathra Devi, C., Mohanasrinivasan, V., Chetna, M., Nikhil, A. S., & Jemimah Naine, S. (2015). Thermostable lipase from novel *Pseudomonas* sp. VITSDVM1 isolated from bovine milk. *Frontiers in Life Science*, 8(2), 165–171. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1015057>
- Suci, M., Arbianti, R., & Hermansyah, H. (2018). Lipase production from *Bacillus subtilis* with submerged fermentation using waste cooking oil. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 105(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/105/1/012126>
- Sugihara, A., Shimada, Y., & Tominaga, Y. (1988). Purification and Characterization of

- Aspergillus niger* Lipase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(6), 1591–1592.  
<https://doi.org/10.1271/bbb1961.52.1591>
- Sugihara, A., Ueshima, M., Shimada, Y., Tsunasawa, S., & Tominaga, Y. (1992). Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*. *Journal of Biochemistry*, 112(5), 598–603.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123946>
- 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>
- Sun, Y., Shi, Q. H., Zhang, L., Zhao, G. F., & Liu, F. F. (2011). *Adsorption and Chromatography. Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Second Edi, Vol. 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00123-9>
- Sun, Z., Liu, Q., Qu, G., Feng, Y., & Reetz, M. T. (2019). Utility of B-Factors in Protein Science: Interpreting Rigidity, Flexibility, and Internal Motion and Engineering Thermostability. *Chemical Reviews*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00290>
- Suzuki, M., Aki, A., Mizuki, T., Maekawa, T., Usami, R., & Morimoto, H. (2015). Encouragement of enzyme reaction utilizing heat generation from ferromagnetic particles subjected to an AC magnetic field. *PLoS ONE*, 10(5), 1–11.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127673>
- Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., & Wang, F. (2010). Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*, 28(5), 628–634.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.05.012>
- Technologies, A. (2011). Manual: pESC Yeast Epitope Tagging Vectors, 217451, 1–21. Retrieved from [http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/217451.pdf%5Cnfile://Users/Eser/Google Drive/Papers2/Articles/2011/Technologies/2011 Technologies.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/3BF4C99A-694B-407C-8DB8-04DCC0DF202B](http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/217451.pdf%5Cnfile://Users/Eser/Google%20Drive/Papers2/Articles/2011/Technologies/2011%20Technologies.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/3BF4C99A-694B-407C-8DB8-04DCC0DF202B)
- Thangaraj, B., & Solomon, P. R. (2019). Immobilization of Lipases – A Review. Part I: Enzyme Immobilization. *ChemBioEng Reviews*, 6(5), 157–166.  
<https://doi.org/10.1002/cben.201900016>
- Thapa, S., Li, H., OHair, J., Bhatti, S., Chen, F.-C., Nasr, K. A., ... Zhou, S. (2019). Biochemical Characteristics of Microbial Enzymes and Their Significance from Industrial Perspectives. *Molecular Biotechnology*, 61(8), 579–601.  
<https://doi.org/10.1007/s12033-019-00187-1>
- ThermoScientific. (n.d.). Pierce BCA Protein Assay Kit. Retrieved February 16, 2022, from <https://assets.thermofisher.com/TFS->

- 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>
- Toscano, L., Montero, G., Cervantes, L., Stoytcheva, M., Gochev, V., & Beltrán, M. (2013). Production and partial characterization of extracellular lipase from *trichoderma harzianum* by solid-state fermentation. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, *27*(3), 3776–3781. <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2012.0140>
- Trodler, P., Nieveler, J., Rusnak, M., Schmid, R. D., & Pleiss, J. (2008). Rational design of a new one-step purification strategy for *Candida antarctica* lipase B by ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1179*(2), 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.11.108>
- Tyndall, J. D. A., Sinchaikul, S., Fothergill-Gilmore, L. A., Taylor, P., & Walkinshaw, M. D. (2002). Crystal structure of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. *Journal of Molecular Biology*, *323*(5), 859–869. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01004-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01004-5)
- Undurraga, D., Markovits, A., & Erazo, S. (2001). Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction. *Process Biochemistry*, *36*(10), 933–939. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00260-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00260-0)
- Valax, P., & Georgiou, G. (1993). Molecular Characterization of  $\beta$ -Lactamase Inclusion Bodies Produced in *Escherichia coli*. 1. Composition. *Biotechnology Progress*, *9*(5), 539–547. <https://doi.org/10.1021/bp00023a014>
- Vallejo, L. F., & Rinas, U. (2004). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories*, *3*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-3-11>
- Van Den Ent, F., & Löwe, J. (2006). RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *67*(1), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.12.008>
- Van Der Kamp, M. W., Perruccio, F., & Mulholland, A. J. (2008). High-level QM/MM modelling predicts an arginine as the acid in the condensation reaction catalysed by citrate synthase. *Chemical Communications*, (16), 1874–1876. <https://doi.org/10.1039/b800496j>
- Van Rie, J., & Thielemans, W. (2017). Cellulose-gold nanoparticle hybrid materials. *Nanoscale*, *9*(25), 8525–8554. <https://doi.org/10.1039/c7nr00400a>
- Varnerin, J. P., Smith, T., Rosenblum, C. I., Vongs, A., Murphy, B. A., Nunes, C., ... Tota, M. R. (1998). Production of leptin in *Escherichia coli*: A comparison of methods. *Protein Expression and Purification*, *14*(3), 335–342. <https://doi.org/10.1006/prep.1998.0978>

- Walsh, G. (2010). Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. *Drug Discovery Today*, 15(17–18), 773–780. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.06.009>
- Walsh, G. (2014). Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nature Biotechnology*, 32(10), 992–1000. <https://doi.org/10.1038/nbt.3040>
- Wang, L., Aryal, U. K., Dai, Z., Mason, A. C., Monroe, M. E., Tian, Z. X., ... Qian, W. J. (2012). Mapping N-linked glycosylation sites in the secretome and whole cells of *aspergillus niger* using hydrazide chemistry and mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 11(1), 143–156. <https://doi.org/10.1021/pr200916k>
- Wang, P. (2006). Nanoscale biocatalyst systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(6), 574–579. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.10.009>
- Wang, X., Yu, X., & Xu, Y. (2009). Homologous expression, purification and characterization of a novel high-alkaline and thermal stable lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(2), 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.05.004>
- West, S. M., Chaudhuri, J. B., & Howell, J. A. (1998). Improved protein refolding using hollow-fibre membrane dialysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 57(5), 590–599. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980305\)57:5<590::AID-BIT11>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980305)57:5<590::AID-BIT11>3.0.CO;2-G)
- Winkler, J., Seybert, A., König, L., Pruggnaller, S., Haselmann, U., Sourjik, V., ... Bukau, B. (2010). Quantitative and spatio-temporal features of protein aggregation in *Escherichia coli* and consequences on protein quality control and cellular ageing. *EMBO Journal*, 29(5), 910–923. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.412>
- Woodley, J. M. (2019). Accelerating the implementation of biocatalysis in industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(12), 4733–4739. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09796-x>
- Woodley, J. M. (2020). New frontiers in biocatalysis for sustainable synthesis. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 21, 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.08.006>
- Wu, L., Liu, B., Hong, Y., Sheng, D., Shen, Y., & Ni, J. (2010). Residue Tyr224 is critical for the thermostability of *Geobacillus* sp. RD-2 lipase. *Biotechnology Letters*, 32(1), 107–112. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0121-3>
- Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C., & Kim, W. S. (2015). Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Science and Technology of Advanced Materials*, 16(2). <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/2/023501>
- Xu, J., Banerjee, A., Pan, S. H., & Li, Z. J. (2012). Galactose can be an inducer for production of therapeutic proteins by auto-induction using *E. coli* BL21 strains.

- Protein Expression and Purification*, 83(1), 30–36.  
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.02.014>
- Xu, L., Ke, C., Huang, Y., & Yan, Y. (2016). Immobilized aspergillus Niger lipase with SiO<sub>2</sub> nanoparticles in sol-gel materials. *Catalysts*, 6(10), 1–12.  
<https://doi.org/10.3390/catal6100149>
- Xu, Y., Nordblad, M., Nielsen, P. M., Brask, J., & Woodley, J. M. (2011). In situ visualization and effect of glycerol in lipase-catalyzed ethanolsis of rapeseed oil. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72(3–4), 213–219.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.06.008>
- Yagmurov, E. R., Kozlov, G. V., & Pushkarev, M. A. (2017). Lipase purification: The review of conventional and novel methods. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 20, 60–69.
- Yang, G., & Ding, Y. (2014). Recent advances in biocatalyst discovery, development and applications. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 22(20), 5604–5612.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.06.033>
- Yang, H., Li, J., Du, G., & Liu, L. (2017). *Microbial Production and Molecular Engineering of Industrial Enzymes: Challenges and Strategies. Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00006-6>
- Yang, J. W., Chandler, C., Stadler, M., Kampen, D., & List, B. (2008). Proline-catalysed Mannich reactions of acetaldehyde. *Nature*, 452(7186), 453–455.  
<https://doi.org/10.1038/nature06740>
- Yong, S. K., Lim, B. H., Saleh, S., & Tey, L. H. (2016). Optimisation, purification and characterisation of extracellular lipase from *Botryococcus sudeticus* (UTEX 2629). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 126(Utex 2629), 99–105.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.02.004>
- Zeng, H., & Yang, A. (2019). Quantification of proteomic and metabolic burdens predicts growth retardation and overflow metabolism in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(6), 1484–1495.  
<https://doi.org/10.1002/bit.26943>
- Zhang, C., Zhang, Y., Hao, X., Liu, H., Lv, X., Zhu, J., ... Zhang, Y. (2018). Fabrication of reduced graphene oxide/chitosan composite fiber by dry-jet wet spinning. *Advanced Composites and Hybrid Materials*, 1(2), 347–355.  
<https://doi.org/10.1007/s42114-018-0029-2>
- Zhang, G., Ren, H., Wang, S., Chen, X., Yang, Y., Zhang, Y., & Jiang, Y. (2014). *Janibacter indicus* sp. nov., isolated from hydrothermal sediment of the Indian Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 7), 2353–2357. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.059527-0>

- Zhang, W., Lu, J., Zhang, S., Liu, L., Pang, X., & Lv, J. (2018). Development an effective system to expression recombinant protein in *E. coli* via comparison and optimization of signal peptides: Expression of *Pseudomonas fluorescens* BJ-10 thermostable lipase as case study. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0894-y>
- Zhang, X. F., Ai, Y. H., Xu, Y., Yu, X. W., Wu, L., Liu, B., ... Roiban, G.-D. (2019). Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. *Bioresource Technology*, 5(1), 478–488. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.008>
- Zheng, C. (2018). Screening and identification of Lipase Producing Bacterium. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 108(4). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/108/4/042088>
- Zhou, X. X., Wang, Y. B., Pan, Y. J., & Li, W. F. (2008). Differences in amino acids composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins. *Amino Acids*, 34(1), 25–33. <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0589-x>
- Zhou, Y. J., Hu, C. L., Wang, N., Zhang, W. W., & Yu, X. Q. (2013). Purification of porcine pancreatic lipase by aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 926, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.03.005>
- Žnidaršič-Plazl, P. (2021). Biocatalytic process intensification via efficient biocatalyst immobilization, miniaturization, and process integration. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 32. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100546>
- Zucca, P., Fernandez-Lafuente, R., & Sanjust, E. (2016). Agarose and its derivatives as supports for enzyme immobilization. *Molecules*, 21(11), 1–25. <https://doi.org/10.3390/molecules21111577>



# Anexo

---





# A novel thermophilic and halophilic esterase from *Janibacter* sp. R02, the first member of a new lipase family (Family XVII)



Agustín Castilla<sup>a</sup>, Paola Panizza<sup>a</sup>, Diego Rodríguez<sup>a</sup>, Luis Bonino<sup>a</sup>, Pilar Díaz<sup>b</sup>, Gabriela Irazoqui<sup>a</sup>, Sonia Rodríguez Giordano<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Bioscience Department, Facultad de Química, Universidad de la República, Gral. Flores 2124, 11800 Montevideo, Uruguay

<sup>b</sup> Dept. Genetics, Microbiology & Statistics, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 15 July 2016

Received in revised form

24 November 2016

Accepted 31 December 2016

Available online 31 December 2016

### Keywords:

Esterase

*Janibacter*

Thermophilic

Halophilic

## ABSTRACT

*Janibacter* sp. strain R02 (BNM 560) was isolated in our laboratory from an Antarctic soil sample. A remarkable trait of the strain was its high lipolytic activity, detected in Rhodamine-olive oil supplemented plates. Supernatants of *Janibacter* sp. R02 displayed superb activity on transesterification of acyl glycerols, thus being a good candidate for lipase prospection. Considering the lack of information concerning lipases of the genus *Janibacter*, we focused on the identification, cloning, expression and characterization of the extracellular lipases of this strain. By means of sequence alignment and clustering of consensus nucleotide sequences, a DNA fragment of 1272 bp was amplified, cloned and expressed in *E. coli*. The resulting recombinant enzyme, named LipJ2, showed preference for short to medium chain-length substrates, and displayed maximum activity at 80 °C and pH 8–9, being strongly activated by a mixture of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>. The enzyme presented an outstanding stability regarding both pH and temperature. Bioinformatics analysis of the amino acid sequence of LipJ2 revealed the presence of a consensus catalytic triad and a canonical pentapeptide. However, two additional rare motifs were found in LipJ2: an SXXL β-lactamase motif and two putative Y-type oxyanion holes (YAP). Although some of the previous features could allow assigning LipJ2 to the bacterial lipase families VIII or X, the phylogenetic analysis showed that LipJ2 clusters apart from other members of known lipase families, indicating that the newly isolated *Janibacter* esterase LipJ2 would be the first characterized member of a new family of bacterial lipases.

Published by Elsevier Inc.

## 1. Introduction

Lipases (EC 3.1.1.3) and carboxylesterases (E.C. 3.1.1.1) are enzymes that hydrolyze the carboxyl ester bonds in acyl-glycerides. They differentiate on the length of their substrate; while lipases prefer long chain acylglycerols, esterases hydrolyze short chain glycerol esters. Despite this difference, they are collectively referred to as lipases or “lipolytic enzymes” [1,2]. Microbial lipases are the third largest group of industrial biocatalysts after bacterial amylolytic enzymes and proteases [3]. They are used in biotechnological applications in different sectors such as pharmaceutical, cosmetic, food, detergent, leather, textile, paper and biodiesel industries [4–7]. The increasing demand for environmentally friendly industrial processes has encouraged the use of biocatalysts in industry, and has triggered new research in this field. Much work has been done on the discovery and characterization of thermophilic

enzymes, since they display characteristics that are ideal to industrial processes such as thermal stability and tolerance to harsh reaction conditions [8,9]. Several thermophilic lipases have been characterized to date, from both, Bacteria [10] and Archaea [11], with the later comprising the most thermostable enzymes. Only a few lipases from Archaea have been characterized and they show extremely high optimal temperatures, ranging from 90 to 100 °C [11,12]. Most thermostable lipases characterized in Bacteria have been isolated from *Bacillus* strains, showing optimal temperatures between 50 and 70 °C [10] like other characterized bacterial enzymes. Some exceptions are the lipases isolated from *Caldanaerobacter subterraneus*, *Thermoanaerobacter thermohydro-sulfuricus* DSM7021 [13], and *Marinobacter lipolyticus* SM19 [2], with optimal temperatures ranging from 75 to 80 °C. Highly thermostable lipases are mostly produced by thermophilic bacteria, although some mesophilic bacteria like *Burkholderia cepacia* [14], *Pseudomonas* [15,16], and *Amycolatopsis mediterranei* [17], have also been reported to produce thermostable enzymes, including a hyperthermophilic enzyme from *Pseudomonas* [18].

\* Corresponding author.

E-mail address: [soniar@fq.edu.uy](mailto:soniar@fq.edu.uy) (S. Rodríguez Giordano).

Despite the large number of microbial lipases identified, cloned, and characterized to date, they are still narrowed to a small portion of the microbial diversity. Scarce information concerning the lipases of the genus *Janibacter* is available. A few strains have been isolated from different environments and have shown lipolytic activity [19,20]. Recently, a mono and di-acyl glycerol lipase MAJ1 from *Janibacter* HTCC2649, belonging to Family I.7, has been isolated and characterized. The optimum activity of this enzyme occurred at pH 7.0 and 30 °C, and it retained 50% of the optimum activity at 5 °C, indicating that MAJ1 is a cold-active lipase [21].

*Janibacter* strains are halotolerant microorganisms [22,23], and thus, they can constitute a source of halophilic enzymes. In addition to thermostable lipases, halophilic enzymes are also interesting for biotechnological applications [24]. Their ability to work in the presence of low water activity could be useful in harsh industrial environments where enzymatic reactions need to be carried out in organic solvents or in the presence of other chemicals.

*Janibacter* sp. strain R02 (BNM 560) was previously isolated in our laboratory from an Antarctic soil sample. A remarkable trait of this strain was its high extracellular lipolytic activity, thus being a good candidate for lipase prospection. Herein we describe the identification, cloning, expression and characterization of a novel esterase, LipJ2, from *Janibacter* sp. R02. This enzyme displays an optimal temperature of 80 °C, being extremely thermostable. In addition, it is alkalophilic and halophilic, constituting the first report of an extremophilic enzyme described from the genus *Janibacter*. The discovery of LipJ2 and the knowledge of its particular characteristics, along with a phylogenetic and structural analysis, provided evidence to propose the existence of a new family of bacterial lipases. Following the criteria and the nomenclature established by Arpigny and Jaeger [1], LipJ2 would be the first member assigned to a newly proposed bacterial lipase family designated as family XVII [25,26].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strains and growth conditions

*Janibacter* sp. R02 was isolated from an Antarctic soil sample. Lipolytic activity was assayed in Rhodamine-Olive Oil plates and by hydrolysis of triolein with the extracellular enzyme fraction. Identification of the strain was performed by physiological test and 16S rRNA sequencing. Growth curves were performed in TSB, at 150 rpm, at 20, 28 and 35 °C respectively, and the optimal growth temperature was determined to be 28 °C. The strain was routinely grown in Tryptic Soy (TSA) agar plates at 28 °C for 24 h and in TSB broth at 28 °C and 150 rpm for 48 h. The original strain was kept frozen at –70 °C in TSB supplemented with 15% glycerol. *E. coli* BL21(DE3) and *E. coli* Rossetta were assayed for LipJ2 expression. These strains were cultivated at 37 °C in Luria–Bertani (LB) agar plates or on LB broth, both supplemented with ampicillin (50 µg/mL) at 37 °C and 200 rpm.

### 2.2. DNA manipulation and cloning

Most DNA manipulations were carried out according to Sambrook and Russell [27]. *Janibacter* R02 genomic DNA was isolated according to a modified procedure using glass beads and CTAB [28]. Plasmid DNA was purified using commercial kits (Invitrogen Midiprep). DNA samples were routinely analyzed by agarose gel electrophoresis and stained with GoodView. Thermostable polymerases Taq Platinum (Invitrogen) and Phusion (Thermo) were used according to the manufacturer's instructions. PCR amplifications were performed in an Applied Biosystems ABI2720 (Applied Biosystems) thermal cycler using appropriate cycling periods.

**Table 1**

Primers used for *lipJ2* gene identification and cloning.

Primer	Sequence
JNB.18b	5'-CGACAGGTGCGCCCG GTC-3'
JNB18RVG72	5'-CCGCCCGCCTGCCAGTAGCC-3'
SP2FwLipJ_pos112	5'-GGCACCCACACTACATGGTCC-3'
SP1RvLipJ_pos112	5'-GGACCATGTAGGTGTGGGTGCC-3'
SP2RvLipJ_pos34	5'-CGTACTCGACGAGGCTCTCCATCTG –3'
SP1FwLipJ_pos34	5'-CAGATGGAGAGCCTCGTCGAGTACG-3'
Arb1-1	5'-GGCCACGGGTGCTAGTCA NNNNNNNNNN CGACG-3'
Arb1-2	5'-GGCCACGGGTGCTAGTCA NNNNNNNNNN CGTCG-3'
Arb1-3	5'-GGCCACGGGTGCTAGTCA NNNNNNNNNN GTCGG-3'
Arb1-4	5'-GGCCACGGGTGCTAGTCA NNNNNNNNNN TCGAC-3'
Arb1-5	5'-GGCCACGGGTGCTAGTCA NNNNNNNNNN CGCGG-3'
Arb1-6	5'-GGCCACGGGTGCTAGTCA NNNNNNNNNN TCGGC-3'
Arb2	5'-GGCCACGGGTGCTAGTCA-3'
LipJ2_Fw	5'-ATGACTCCATGACCAAGCCGCCGTC-3'
LipJ2_Rv	5'-TCACAGACGCCAGCAGGATTGACC-3'

AP-PCR was performed according to the procedure reported by Das et al. [29], although primers were modified to fit *Janibacter* genome. For *lipJ2* identification, degenerated primers JNB.18b and JNB18RVG72 (Table 1) were used to amplify a central consensus region, using *Janibacter* R02 genomic DNA as a template. AP-PCR and sequencing allowed identification of the complete *lipJ2* gene. Specific primers SP1RvLipJ\_pos112 and SP1FwLipJ\_pos34 were used along with degenerate primers Arb1-1 to Arb1-6 to amplify the external sequences. The 3' five bases long random sequences for primers Arb1-1 to 1–6 were designed based on the most common five bases motifs found in *Janibacter* genome. Nested PCR was then performed with Arb2 and either SP2FwLipJ\_pos112 or SP2RvLipJ\_pos34 in order to specifically amplify the upstream and downstream DNA fragments. Sequencing of all amplicons was performed at Macrogen, Korea. ContigExpress was used to assemble the amplified DNA sequences (Vector NTI, version 8; Invitrogen, Carlsbad, CA). The sequence of *lipJ2* gene was deposited in GenBank under accession number KX096709.

Specific primers LipJ\_Fw\_NdeI and LipJ\_Rv\_HindIII were designed for PCR amplification of the complete *lipJ2* gene. Amplified DNA was purified from agarose gels and ligated to the *Nde*I/*Hind*III digested pET22b+ vector. The resulting recombinant plasmid, pET22b-LipJ2 was transformed into *E. coli* BL21(DE3) and *E. coli* Rossetta for expression.

Gene synthesis with optimized codons and final cloning in pET 22b+ expression vector was performed at GeneScript, USA. The resulting recombinant plasmid, pET 22b-LipJ2- HisN, was transformed into *E. coli* BL21(DE3), producing the recombinant clone *E. coli* BL21(DE3) (pET22b-LipJ2-HisN), used in this work.

### 2.3. Analysis of Lip J2 sequence

DNA sequences were analyzed and translated using Vector NTI software package (Invitrogen). A sequence similarity search performed in the Protein Data Bank revealed that the closer crystalized structure was 2VEO (*Candida antartica* CaIA lipase in its closed state). A 3D model of LipJ2 was constructed with Swiss-model [30–32] using the reported 3D structure of *Candida antartica* CaIA lipase (2VEO) as a template [33]. PyMOL software (PyMOL molecular graphics system, version 1.2r3pre; Schrödinger, LLC) was used to visualize the 3D protein model.

Search and alignment of nucleotide and amino acid sequences were performed using BLAST [34] or Clustal O Multalign [35,36]. Identification of putative signal peptide was performed through SignalP software (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) [37,38]. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets [39]. The evolutionary history was inferred by using the

Maximum Likelihood method based on the Whelan and Goldman model [40]. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained by applying the Neighbor-Joining method to a matrix of pairwise distances estimated using a JTT model. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (2 categories (+G, parameter = 1.3222)). The rate variation model allowed for some sites to be evolutionarily invariable ([+I], 5.0445% sites). Enzyme classification and family assignment were performed with the CLANS (Cluster Analysis of Sequences) program (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/clans>) [41]. P values for high-scoring segment pairs (HSPs) better than 0.05 were considered to be significant.

#### 2.4. LipJ2 production and purification

Fresh plates of *E. coli* BL21(DE3) (pET22b-LipJ2-HisN) were streaked from frozen stocks, and a single colony was used to inoculate 5 mL of LB-Amp. The culture was incubated in a rotary shaker overnight (200 rpm, 37 °C), and 1 mL of this culture was used to inoculate 100 mL of fresh LB-ampicillin in a 500 mL Erlenmeyer flask. The fresh culture was grown under the same conditions until it reached an OD<sub>600</sub> of 0.5 (approximately 2.5 h), and then IPTG was added to a final concentration of 1 mM. After 5 h induction at 20 °C, recombinant *E. coli* cells were harvested by centrifugation, and disrupted by sonication (3 s pulses at 20% of amplitude during 20 s, repeated 4 times). The cellular debris was separated by centrifugation and LipJ2 protein was purified from inclusion bodies (IB). For renaturing LipJ2, a refolding process by dilution was followed as described by Mayer and Buchner [42]. Renaturing conditions were established by the Recombinant Protein Unit at Institute Pasteur, Montevideo, Uruguay [43].

Solubilized LipJ2 was finally purified by Ion Metal Affinity Chromatography using a Ni(II)-IDA-Sepharose column; the enzyme was eluted using an increasing concentration gradient of imidazole (0–300 mM). The eluted protein was dialyzed twice against 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, and stored at –20 °C for further characterization. The homogeneity of the purified enzyme and its molecular weight were determined by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis performed according to the standard procedures [44].

#### 2.5. Protein determination

LipJ2 concentration was estimated by the bicinchoninic acid (BCA) assay using bovine serum albumin as the standard [45].

#### 2.6. Enzymatic activity assays

##### 2.6.1. General procedure

The activity was assayed at 50 °C using 4-MUF-butyrate as a model substrate [46,47]. Unless otherwise specified, all assays were done on microtiter plates, performing three repetitions in each replicate and at least two replicates per assay. Three blanks were always done for each set of conditions (reaction mixture without enzyme, without substrate and without neither the enzyme nor the substrate).

A suitably diluted enzyme solution was prepared in 50 mM Tris.HCl buffer pH 8.0 and mixed at a 1:1 ratio in a final volume of 100  $\mu$ L with the substrate mix solution (0.8% Triton X-100 and 0.8 mM MUF- butyrate). The reaction mixture was supplemented to a final concentration of 1 mM NaCl and 1 mM KCl. All solutions were pre-incubated at 50 °C. The rate of formation of free MUF was measured by the released fluorescence at 50 °C for 30 min in a Synergy HTX Biotek spectrofluorometer ( $\lambda_{\text{exc}} = 323 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 448 \text{ nm}$ ). The enzyme activity determination was based on a previously obtained

MUF calibration curve. The catalytic unit was defined as the amount of enzyme that released 1  $\mu$ mol of MUF in 1 min, at pH 8.0, and 50 °C.

#### 2.7. Effect of metal ions on enzyme activity

The effect of metal ions on enzyme activity were determined by using various metal salts (NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CoSO<sub>4</sub>, NiSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>) at final concentrations of 1, 10 or 20 mM in the reaction mixture. The enzymatic assay was done as described on *General Procedure* (pH 8.0 and 50 °C) in presence of each metal ion. Reaction mixture without metal ion was used as a control.

#### 2.8. Effect of pH on enzyme activity

The effect of the pH on enzyme activity was performed at 50 °C, using 50 mM ATB buffer [47] (50 mM acetic acid, 50 mM Tris-HCl, 50 mM boric acid) of the specified pH, and supplemented to a final concentration of 1 mM NaCl and 1 mM KCl in the reaction mixture.

#### 2.9. Effect of temperature on enzyme activity

To determine the effect of the temperature on the enzyme activity the reaction mixture was prepared as described in *General Procedure* (pH 8.0, 1 mM NaCl and 1 mM KCl as final concentration) and incubated at different temperatures; after 15 min the enzymatic reaction was stopped by cooling the mixture in an ice bath for 5 min. The amount of MUF released was measured as described above.

#### 2.10. pH and temperature stability

pH stability was studied by incubating samples of the enzyme in 50 mM ATB buffer at different pHs for 24 h at 4 °C. After incubation, activity assays were performed according to the *General Procedure* (50 °C, pH 8.0, 1 mM NaCl and 1 mM KCl as final concentration in the reaction mixture).

Temperature resistance was studied by incubating samples of the enzyme in activity buffer at different temperatures for 1 h. After incubation, activity assays were performed according to the *General Procedure* (50 °C, pH 8.0, 1 mM NaCl and 1 mM KCl as final concentration in the reaction mixture).

#### 2.11. Effects of inhibitors, detergents, denaturants on enzyme activity

Activity assays were performed as described in *General Procedures* (50 °C, pH 8.0, 1 mM NaCl and 1 mM KCl as final concentration in the reaction mixture) including in the reaction mixture different concentration of SDS (0–2% w/v), Triton<sup>®</sup> X-100 (0–2% v/v), urea (0–5 M) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (0–3 mM).

#### 2.12. Determination of kinetic parameters $K_M$ and $k_{\text{cat}}$

The kinetic parameters were determined performing the activity assay described on *General Procedure* (50 °C, pH 8.0, 1 mM NaCl and 1 mM KCl as final concentration in the reaction mixture) using varying concentrations of 4-MUF-butyrate (25–400  $\mu$ M).

Kinetic parameters were determined by Lineweaver-Burk linearization of the Michaelis Menten equation [48].

The sequence of *lipJ2* gene was deposited in GenBank under accession number KX096709.

### 3. Results

#### 3.1. Identification of *Janibacter R02* sp

Strain R02 was isolated from an Antarctic soil sample and selected due to its ability to hydrolyze olive oil. Preliminary assays performed using culture supernatants showed transesterification activity with triolein and methanol (data not shown).

Through specific biochemical tests and analysis of the 16S rRNA nucleotide sequence, the strain was identified as *Janibacter*, a pleomorphic Gram-positive bacterium of the *Intrasporangiaceae* family belonging to *Actinobacteria* [22,23]. The optimal growth temperature for this strain was determined to be 28 °C.

#### 3.2. Isolation and cloning of *Janibacter R02* extracellular esterase

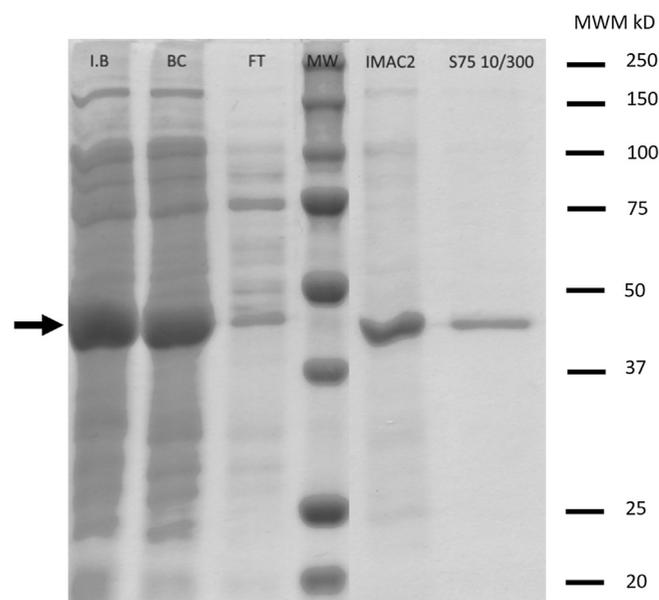
Based on *Janibacter* HTCC2649 genome, potential *Janibacter* lipase coding sequences were identified and aligned with known lipases from genomic databases. Degenerate primers were designed based on the conserved regions of four different lipase clusters in order to amplify potential lipases. Amplification with primers JNB\_18b and JNB18RVG72 resulted in a 261 bp amplicon showing 59% sequence identity with ORFJNB\_18408, annotated as uncharacterized protein in the databases (<http://www.uniprot.org/uniprot/A3TQM4>), although it also clustered with several secretory lipases from the genera *Amycolatopsis* and *Micrococcus*. Furthermore, the sequence obtained showed 98% identity with a newly deposited sequence, WP\_007927380.1 from *Janibacter hoylei* [49].

From the internal fragment sequence obtained, AP-PCR was performed to unveil the sequence of the complete ORF [29]. Nucleotide and amino acid sequence analysis revealed that the newly discovered ORF encodes for a 423 amino acid protein showing 99% identity with the above mentioned hypothetical secretory lipase from *Janibacter hoylei* [49]. The novel esterase was deposited in the database as KX096709 (BankIt).

The complete identified gene, named *lipJ2*, was amplified with suitable specific primers for cloning into pET 22 b+ in frame with the 6-histidine tag at the carboxy terminus of this vector, and transformed into *E. coli* BL21(DE3) and Rossetta strains. In both cases, expression analysis revealed production of truncated proteins. Analysis of codon preference revealed several potential sites where translation could be halted. Finally, the gene was synthesized and acquired from Genscript with codons optimized for *E. coli* expression, and recombinant *E. coli* BL21(DE3) (pET22-LipJ2-HisN) was obtained. Preliminary assays on protein expression evidenced production of a 44 kDa protein, mainly found as inclusion bodies (Fig. 1).

#### 3.3. LipJ2 sequence and structure analysis

*In silico* translation of the identified *lipJ2* gene revealed a protein with a molecular mass of 44 kDa and a deduced pI of 8.28. Analysis of the sequence for signal peptide predicted the presence of a 28 amino acid long leader sequence with a cleavage site between positions 28 and 29 (ASA-DH) [38], indicating the extracellular location of the enzyme. Presence of the canonical pentapeptide GXSXG (GYSQG) of lipases, including the catalytic serine at position 219 was also confirmed. An aspartic acid and a histidine at positions 360 and 392, respectively, were predicted as the two additional amino acids of the catalytic triad [50]. As expected for a lipase, the sequence bears a significant number of hydrophobic amino acids (49%) clustering mainly in the protein hemisphere where the active site is located, where they might facilitate the lipase attachment to the hydrophobic substrates [51]. Secondary structure analysis of LipJ2 evidenced the typical  $\alpha/\beta$  fold of lipases and the presence of the characteristic nucleophile elbow, constituted by the pentapep-



**Fig. 1.** SDS PAGE 10% of solubilization and purification of LipJ2. Lanes 1: Inclusion Bodies after renaturation; 2: sample applied to IMAC; 3: IMAC pass through; 4: MW: standard of Molecular Weight; 5: fraction from IMAC elution. Arrow indicates the band of the expected molecular weight for LipJ2 (44.0 kDa). Molecular weight of the marker is indicated in the SDS gel.

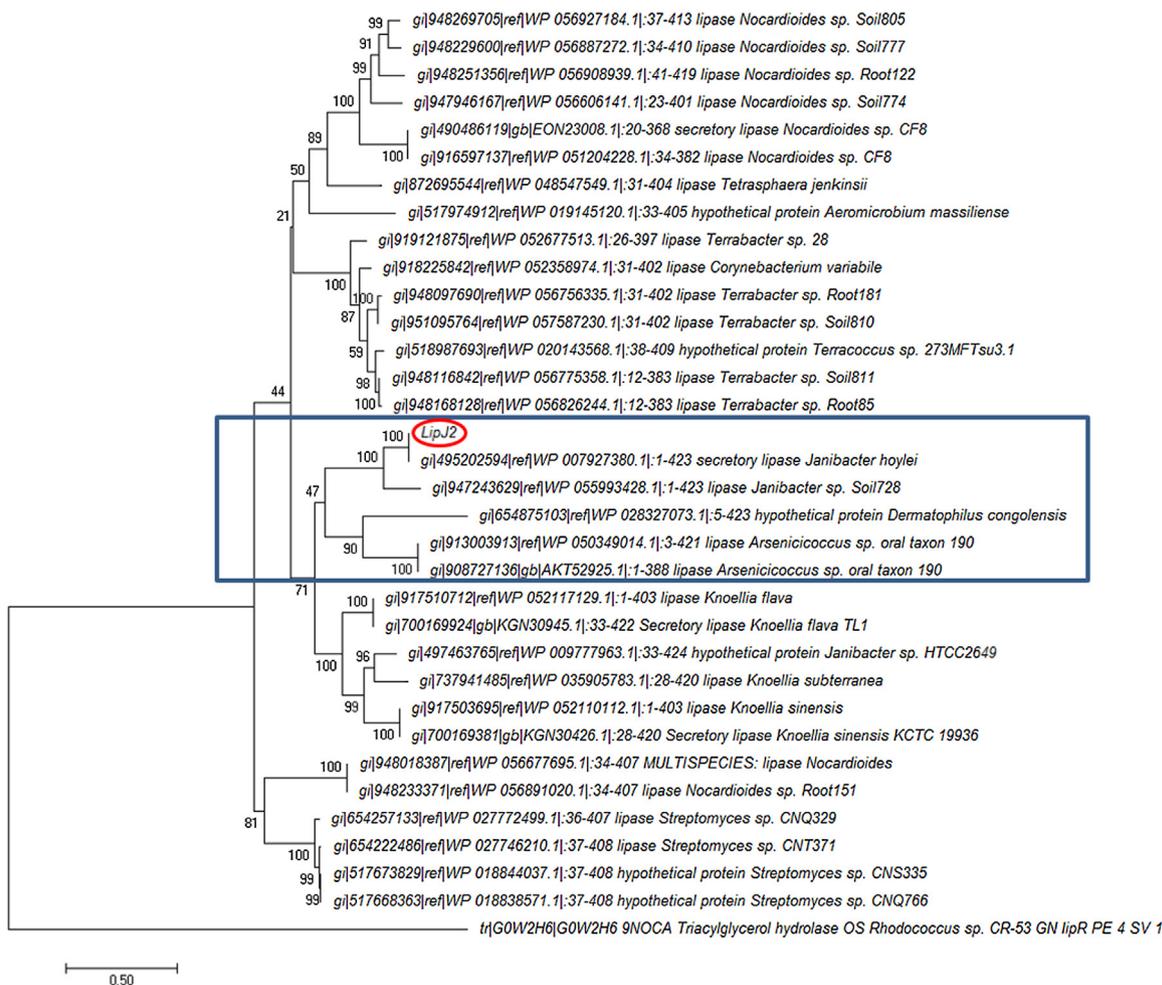
ptide GYSQG with the catalytic serine residue (Ser<sup>219</sup>) embedded in it. Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) and ProDom (<http://prodom.prabi.fr/prodom/>) tools provided evidence for assignment of LipJ2 to the secretory lipase class of enzymes, showing maximum identity at the C-terminus of the protein (amino acids 140–419) [52]. In addition to the classical conserved motifs, LipJ2 displayed also the SXXL consensus pattern of  $\beta$ -lactamases (SALL), also located close to the C-terminus.

#### 3.4. LipJ2 family assignment

BLAST searches revealed several sequences that displayed relevant similarity to LipJ2 [34]. All of them are hypothetical proteins or putative lipases, annotated from microbial genomes, but none of them has been characterized on a biochemical basis. Pfam analysis of the sequence allocated it on the *CL0028* clan, whereas analysis on the Lipase Engineering Database revealed that the closest family is that of *Candida antarctica* lipase A-like enzymes (abH38). Alignment of all the proteins (32) showing over 50% identity was performed, and a phylogenetic tree (Fig. 2) was constructed for all these sequences, along with LipR [53], the closest described lipase. As can be observed in Fig. 2, LipJ2 grouped in a root different from that of LipR (family X). LipJ2 clustered essentially with lipases from Actinobacteria that have not been characterized up to date. In any case, a closer look at the phylogenetic map revealed that the mentioned *Burkholderia* lipase grouped in fact in a cluster clearly separated from that where *Janibacter* LipJ2 was found, indicating that the true phylogenetically related lipases are those of certain Actinobacteria like *Arsenicococcus* or *Dermatophilus*, the closest being *Janibacter hoylei* lipase (WP\_007927380, gi495202594).

#### 3.5. LipJ2 production, purification and characterization

Esterase Lip J2 was produced as inclusion bodies in strain *E. coli* BL21(DE3) (pET22- LipJ2-HisN). For enzyme recovery and purification, a plodding refolding process by dilution was followed as stated in Materials and Methods. The refolded enzyme was finally purified by IMAC and the homogeneity and molecular weight of



**Fig. 2.** Molecular Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method. The tree with the highest log likelihood (−8913.4271) is shown, and the percentage of trees in which the associated taxa clustered together appears next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 34 amino acid sequences, including LipJ2 and LipR [52], and those showing over 50% identity after Blastp search. The accession identifiers of the sequences are stated in the branches' legend.

Lip J2 were determined by SDS-PAGE. Fig. 1, lane 5, corresponding to the eluate of the IMAC chromatography shows a main band of the expected molecular weight for Lip J2 (44.0 kDa). The overall procedure yielded 9 mg of isolated enzyme from 100 mL induced culture.

### 3.6. Lip J2 characterization

#### 3.6.1. Substrate specificity

Activity of Lip J2 towards three commercially available MUF-acyl derivatives was evaluated; Lip J2 showed preference for MUF-butyrate, while activity on longer chains substrates (MUF-heptanoate and MUF-oleate) was significantly lower, indicating that Lip J2 can be considered an esterase. All other assays were performed on MUF-butyrate.

#### 3.7. Effect of metal ions on enzyme activity

Different metal ions were added to the reaction mixture in order to evaluate their influence on enzymatic activity (Fig. 3). Magnesium and calcium showed almost no influence on Lip J2 activity, whereas manganese, iron, cobalt, nickel and copper had a detrimental effect on Lip J2 activity, which was in general more important at 10 mM than at 1 mM. An exception was Zinc that showed an activating effect at 1 mM but a detrimental effect at

10 mM. An interesting result was obtained for  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ . When used separately, no effect was observed neither at 1 mM nor at 10 mM; however, when used together, an important synergic activation effect was observed, with a 2.5-fold activity increase for both concentrations tested (1 and 10 mM). When adding  $\text{Zn}^{2+}$  to the reaction mixture in combination with  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ , activation was observed again but it did not improve the effect produced by the presence of the mixture of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ .

After establishing the activating effect of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  combination, all assays were performed with the addition of 1 mM NaCl and 1 mM KCl to the reaction mixture.

#### 3.7.1. Effect of pH and temperature on LipJ2 activity

Fig. 4 shows the effect of pH and temperature on enzyme activity. LipJ2 activity was evaluated on a wide pH range (pH 2.0–11.0), where the enzyme displayed no activity below pH 5.0 and retained 40% of maximum activity at pH 6.0, and approximately 70% of maximum activity at pH 7.0 and 7.5 (Fig. 4a). Maximum activity for LipJ2 was obtained when working at pH between 8.0 and 9.0. The enzyme showed a drastic drop of activity at higher pH, falling to less than 20% of maximum activity at pH 10.0. Results obtained for pH 11.0 were not consistent due to the high rate of chemical hydrolysis of MUF butyrate observed at this pH.

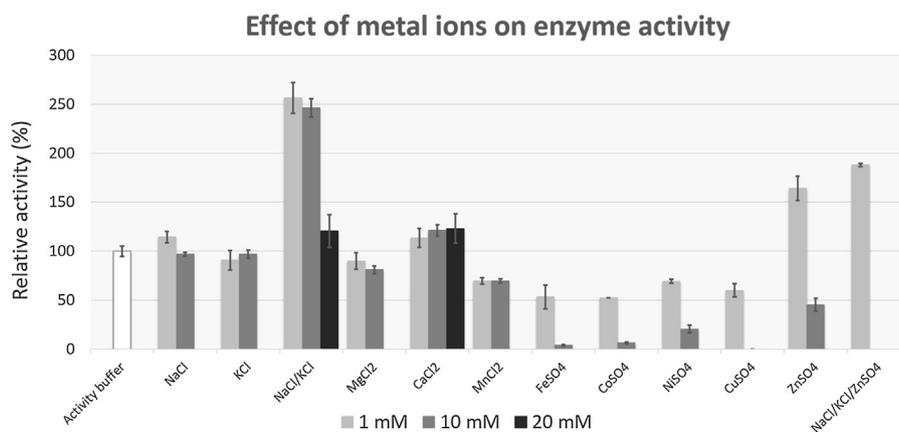


Fig. 3. Effect of different metal ions on purified LipJ2 activity.

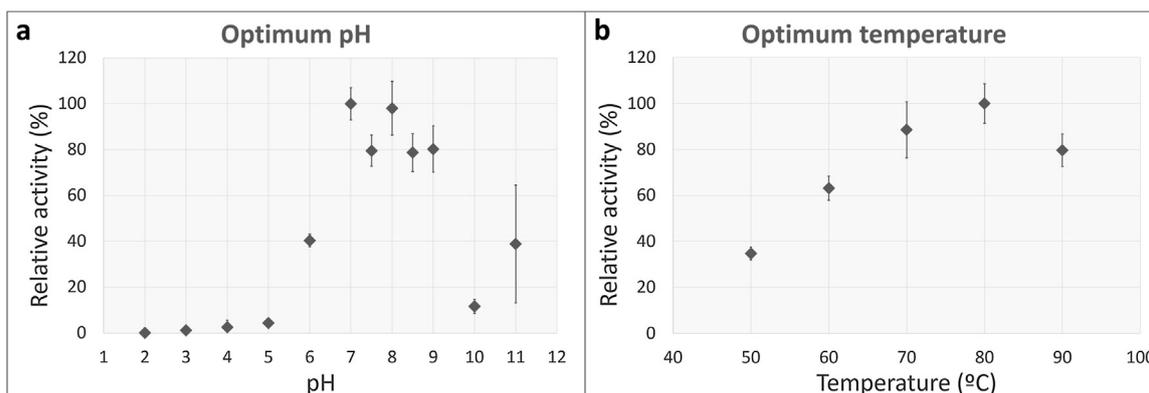


Fig. 4. a) Effect of pH on LipJ2 activity for the hydrolysis of MUF-butyrate b) Effect of temperature on LipJ2 activity for the hydrolysis of MUF-butyrate.

Optimal temperature for LipJ2 activity was evaluated in the range 50–90 °C, and the maximum activity was registered at 80 °C (Fig. 4b).

### 3.7.2. pH and temperature stability

Fig. 5 shows the influence of pH and temperature on enzyme stability. Lip J2 displayed an excellent stability in all the assessed pH ranges (Fig. 5a) after 24 h incubation. Under the tested conditions, acidic pH showed more detrimental effect than alkaline ones. However, at the worst condition assayed, pH 2.0, the percentage of residual activity was still very good (70%). At pH 8.0 and higher, no significant differences were detected between the activity of samples incubated at different pHs and the untreated control sample.

Lip J2 was subjected to incubation at different temperatures to test its thermal stability. LipJ2 showed an excellent stability in all the temperature range tested (Fig. 5b), retaining its activity even when exposed to 1 h incubation at near boiling temperatures.

### 3.7.3. Kinetic parameters

The  $K_m$  and  $k_{cat}$  parameters were determined using Lineweaver-Burk linearization of Michaelis-Menten equation; obtaining values of  $873 \pm 120 \mu\text{M}$  for 4-MUF butyrate and  $21 \pm 4 \text{ min}^{-1}$ , at 50 °C, and pH 8.0 respectively. As expected for esterases, no interfacial activation was observed.

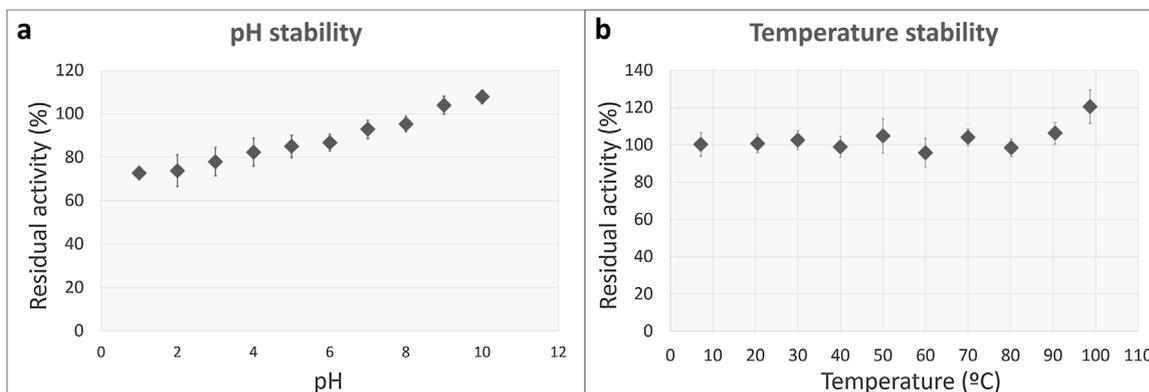
### 3.7.4. Effect of different inhibitors on enzyme activity

The effect of PMFS, SDS, Triton X100 and urea on enzyme activity was evaluated. Phenyl methyl sulphonyl fluoride (PMSF) showed no detrimental effect on enzyme activity. The presence of SDS had

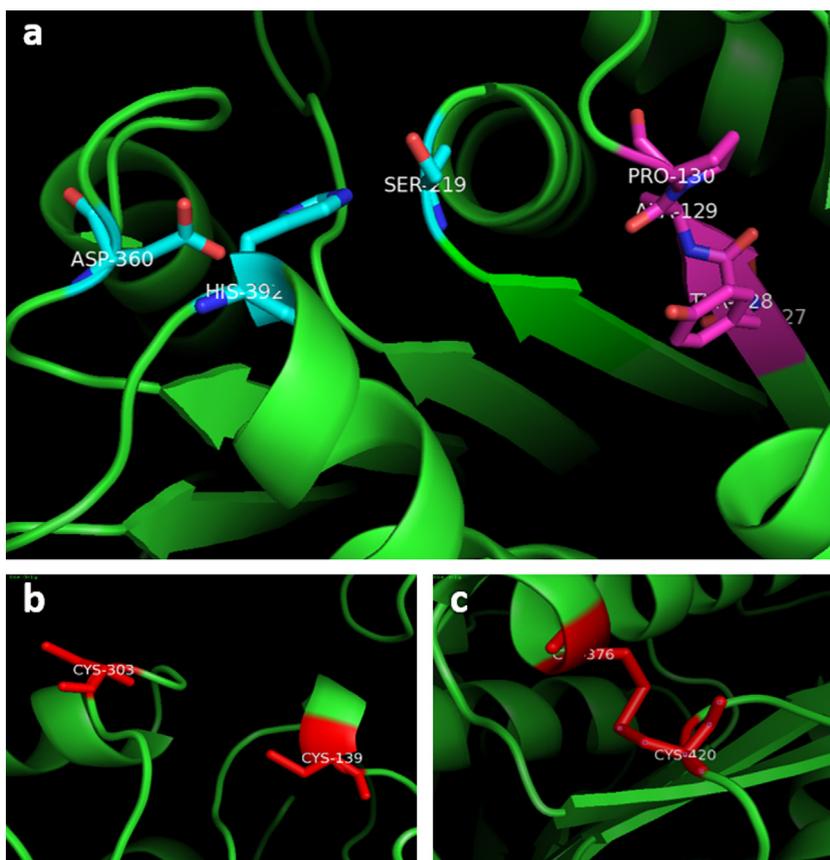
strong negative effects on Lip J2 activity, since at 0.5% (w/v) concentration the enzyme only retained 50% of its maximum activity. For Triton® X-100, the enzymatic activity was reduced to 60% at 0.5% Triton® X-100, retaining around 20% activity at a concentration of 2% (v/v). The effect of the chaotropic agent urea, on the contrary, was far less detrimental than SDS or Triton® X-100. At the lower concentrations assayed (between 0.5 and 2 M), an activating effect was observed. At 3 and 4 M urea the observed activity was similar to that observed in absence of the chaotropic agent, diminishing only 10% at 5 M Urea.

## 4. Discussion

To date, scarce information is available regarding lipases, as well as other potentially important industrial enzymes from the genus *Janibacter*. The isolation and identification of *Janibacter* R02, a strain displaying high lipolytic activity, from an Antarctic soil sample prompted us to search for the enzymes responsible for this activity. Analysis of four different lipase clusters allowed the design of degenerate primers that could amplify a conserved central region of a lipase gene. Following this strategy, a 260 bp internal fragment was amplified and sequenced, showing 98% identity with a newly deposited sequence, WP.007927380.1 from *Janibacter hoylei*, a described specie isolated from cryotubes used for collecting air at the upper atmosphere (40 km altitude), and capable of growing at temperatures below 0 °C [54,49]. AP-PCR was performed with primers adapted for the high GC content of *Janibacter* species. A study of the most common 5 base sequences found in *Janibacter* was performed before designing the AP-PCR primers (Table 1). This



**Fig. 5.** a) Enzyme stability towards pH after 24 h incubation at 4 °C at the corresponding pHs. b) Enzyme stability towards temperature after 1 h incubation at pH 8.0 at the corresponding T.



**Fig. 6.** LipJ2 model based on *Candida antarctica* lipase CalA. a) predicted catalytic triad (cyan) and nucleophilic elbow (purple), b) and c) predicted disulfide bonds.

was essential for successful amplification of the complete *lipJ2* gene coding for LipJ2 protein.

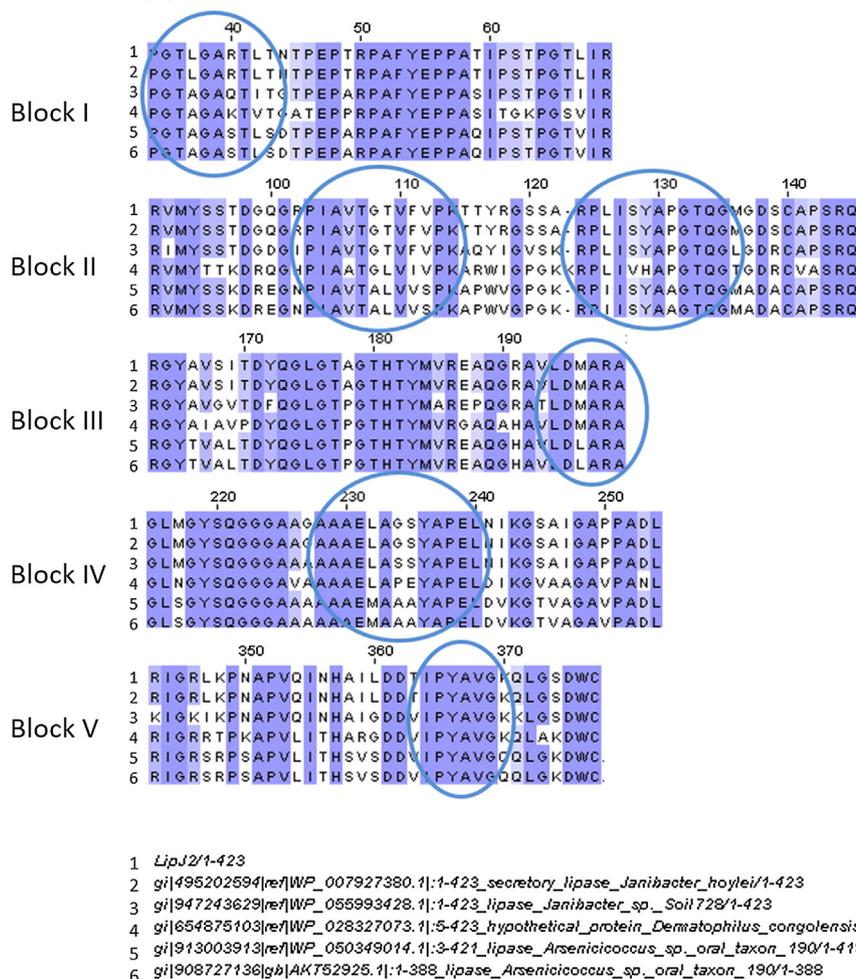
The results obtained from our work indicate that, at least for this protein, the codon bias of *E. coli* differs significantly from that of *Janibacter*, making it difficult to express LipJ2 from its original *lipJ2* sequence. Indeed, synthesis of the gene taking into account *E. coli* codon preference resulted in good expression of LipJ2 from *E. coli* BL21(DE3) (pET 22b-LipJ2-HisN).

A LipJ2 3D structure homology model was constructed using *Candida antarctica* lipase A (CALA; Protein Data Bank accession number 2VEO) [33] as a template (Fig. 6). This allowed confirmation of the predicted catalytic triad Ser<sup>219</sup>, Asp<sup>360</sup>, and His<sup>392</sup> (Fig. 6a). However, PMSF did not inhibit Lip J2 as expected for a serine hydrolase. This fact has been described previously for other

lipases [55–59] and can be due to structural factors that do not allow PMSF to enter the active site [47,56,57]. The existence of four cysteine residues might indicate the presence of disulfide bonds in the tertiary structure of the protein. Indeed, the constructed homology model suggests that the cysteine residues are close enough (Fig. 6b and c) to form disulfide bonds (C139–C303 and C376–C420) that would contribute to make the protein structure more compact and therefore, more stable. Analysis of the amino acid sequence and the 3D structure revealed the presence of three possible oxyanion holes, a GXG-type (GSG, positions 204–206), and two Y-type oxyanion holes (SYAP, positions 127–130 and 235–237). The 3D model constructed revealed that only the putative SYAP 127–130 is in a position that could play the role of an oxyanion hole (Fig. 6a), since the other two are in the external surface of the protein.

## Discriminative Regular Expressions:

1. P-G-T-[LA]-G-A-x-T-x-[TS]
2. P-I-A-[VA]-T-[GA]-[TL]-V-x(2)-P-K
3. R-P-[LI]-I-[SV]-[YH]-A-[PA]-G-T-Q-G
4. L-D-[ML]-A-R-A
5. A-A-A-E-[LM]-A-x(2)-Y-A-P-E-L
6. I-P-Y-A-V-G



**Fig. 7.** Detail of the conserved blocks of sequence among the closest lipases of family XVII, obtained after alignment with Clustal O and Jalview (Java) visualization to highlight residues with an 80% conservation.

The phylogenetic tree constructed with those sequences showing more than 50% identity clearly indicates that LipJ2 clusters apart from other known sequences. The closest characterized lipases are CalA and LipR [33,53], thus CalA was selected as a template structure for model construction. The enzymes that show greater identity with LipJ2 are those belonging to the genus *Janibacter*, *Arsenicoccus* and *Dermatophilus*, two closely related *Actinobacteria*. *Knoelia* and *Terrabacter* lipases group in close phylogenetic proximity but constitute a separate cluster, as confirmed after CLANS analysis. Like for LipJ2, the pentapeptide of all the similar hypothetical lipases was GYSQG, whereas for LipR, clustering apart from the rest of aligned lipases, was GYSGG, unambiguously showing that they belong to different families. The results obtained here, and the lack of identity with lipases from other previously described families suggest that *Janibacter* R02 LipJ2 would be the first described member of a new family of bacterial lipases, for which the conserved blocks of sequence shown in Fig. 7 would constitute a signature. Interestingly, among the six closest lipases, only LipJ2

and the annotated *Janibacter hoylei* secretory lipase (*gi|404555644*) [49] contain the  $\beta$ -lactamase motif SALL, a fact that points to either the acquisition of a new function by these two lipases or to the reminiscence from an ancient activity, which could have been lost after the evolutionary pathway of these enzymes.

LipJ2 showed preference for MUF-butyrate, while activity on longer chains substrates was significantly lower. Surprisingly, the enzyme displayed an extremely high optimal temperature of 80 °C. This was unexpected since *Janibacter* R02 was isolated from the Antarctic soil and it is a mesophilic microorganism. However, as stated earlier, there are precedents of thermophilic enzymes isolated from mesophilic organisms [14–18]. In addition, some thermophilic lipases from other *Actinobacteria* have also been described, in particular from some *Streptomyces* strains. LipS221 from *Streptomyces fradiae* showed maximum activity at 55 °C and pH 9.8 [60]. Similarly, a lipase isolated from *Streptomyces rimosus* was most active at 50–60 °C and pH around 9–10 [61]. This enzyme showed high stability at a broad pH range of

4–10 and was fairly thermostable. A lipase with similar characteristics was isolated from *Streptomyces coelicolor* [56]. All these enzymes are also alkalophilic like LipJ2; however, LipJ2 shows higher optimal temperature. Indeed, LipJ2 shows higher optimal temperature than that reported for most bacterial lipases, with the exception of those lipases isolated from the thermophilic bacteria *Marinobacter lipolyticus* SM19 [2], *Caldanaerobacter subterraneanus* and *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* DSM7021 [13], with optimal temperatures ranging from 75 to 80 °C, and the hyperthermophilic lipase from *Pseudomonas* that has optimal activity at 90 °C and pH 11.0 [18]. Thus, LipJ2 places itself as one of the most thermophilic enzymes isolated from bacteria. Additionally, the enzyme displayed extremely high thermal stability, retaining 100% activity after incubation at 99 °C for one hour. LipJ2 is also an alkalophilic and halophilic enzyme, with optimal activity at pH 8.5 and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> concentration of 10 mM. The behavior of this enzyme related to the presence of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> is intriguing. None of the cations had an effect *per se*; however, the concomitant presence of both of them triggers LipJ2 activity 2.5-fold. This behavior could be explained by the fact that LipJ2 is an extracellular enzyme from a halotolerant microorganism. *Janibacter* genus has different species that derive from very different sources, but all the species show moderate to high halotolerance (6–10% NaCl) [23]. The observed effect of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> can be related to this phenomenon, possibly being a requisite to the habitat where the genus *Janibacter* originated. It could be expected to require just Na<sup>+</sup> ions; however, many organisms prefer to use K<sup>+</sup> counter-ions because K<sup>+</sup> has a much lower water binding rate than Na<sup>+</sup>, thus maximizing the amount of water available for their enzymes [24]. This finding should be taken into account when analyzing enzymes isolated from halophilic or halotolerant microorganisms. Indeed, they might not show activation with either Na<sup>+</sup> or K<sup>+</sup> alone, but a mixture of both cations can have an activating effect, as happens for LipJ2.

It has been reported previously that halophilic enzymes usually have acidic residues in the exterior to cope with high cation concentration [62]. In this case, we observed a large number of acidic residues; however, basic residues were also observed. Since the enzyme is extracellular, this can help stabilizing the structure with both cations and anions present in the surrounding media. Additionally, hydrophobic residues on the exterior are mainly leucine, alanine and glycine, an observation that is in agreement with previous reports indicating that halophilic enzymes will preferentially have short side chain amino acids in the outer shell [24]. All the biochemical, structural and phylogenetic characteristics make us propose LipJ2 as the first characterized member of a new lipase family that would be chronologically assigned as lipase Family XVII.

## 5. Conclusions

In conclusion, a novel esterase LipJ2 from *Janibacter* R02 was identified, cloned and expressed in *E. coli*. The aforementioned biochemical, structural and phylogenetic characteristics indicate that LipJ2 is the first described member of a new lipase family, Family XVII. Additionally, the characteristics of thermophilic, alkalophilic and halophilic and its particular stability in harsh conditions (temperature, pH, urea) make of LipJ2 an interesting enzyme for biotechnological applications.

## Funding

This work was supported by the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons (L/ICA/ICB/187531/13); PEDECIBA Química; CSIC I+D 611; UdelaR; Agencia Nacional de Investigación e Innovación (FSE...1.2014.1.102657); Instituto Antártico Uruguayo; Agencia Española de Cooperación Internacional (Acción

Integrada A2 035635 11); the Scientific and Technological Research Council (MINECO, Spain), grant CTQ2014-59632-R, the V Pla de Recerca de Catalunya, grant 2014 SGR 534, and by the Generalitat de Catalunya to the “Xarxa de Referència en Biotecnologia” (XRB).

## Acknowledgments

The authors would like to acknowledge technical support from Beatriz Munguía and Laura Dominguez, Facultad de Química, UdelaR; and from Pasteur Institute, Montevideo, Uruguay.

## References

- [1] J.L. Arpigny, K.E. Jaeger, Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties, *Biochem. J.* 343 (1999) 177–183.
- [2] D. Pérez, S. Martín, G. Fernández-Lorente, M. Filice, J.M. Guisán, A. Ventosa, M.T. García, E. Mellado, A novel halophilic lipase, LipBL, showing high efficiency in the production of eicosapentaenoic acid (EPA), *PLoS One* 6 (2011), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0023325>.
- [3] L. Vojcic, C. Pitzler, G. Körfer, F. Jakob, R. Martinez, K. Maurer, U. Schwaneberg, Advances in protease engineering for laundry detergents, *New Biotechnol.* 32 (2015) 329–634.
- [4] M. Guncheva, D. Zhiryakova, Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 68 (2011) 1–21.
- [5] S. Cesarini S, R.F. Haller, P. Diaz, P.M. Nielsen, Combining phospholipases and a liquid lipase for one-step biodiesel production using crude oils, *Biotechnol. Biofuels* 7 (2014) 29–35, <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-7-29>.
- [6] R. Gupta, N. Gupta, P. Rathi, Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties, *Appl. Microbiol. Biot.* 64 (2004) 763–781.
- [7] F. Hasan, A.A. Shah, A. Hameed, Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 235–251.
- [8] G. Antranikian, Industrial relevance of thermophiles and their enzymes, in: F.R.G. Antranikian, D.G.A. Driessen (Eds.), *Thermophiles: Biology and Technology at High Temperatures*, CRC Press, Boca Raton, 2008, pp. 113–160.
- [9] H. Atomi, Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9 (2005) 166–173, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.02.013>.
- [10] L. Bora, D. Gohain, R. Das, Recent advances in production and biotechnological applications of thermostable and alkaline bacterial lipases, *J. Chem. Technol. Biot.* 88 (2013) 1959–1970, <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.4170>.
- [11] G.D. Haki, S.K. Rakshit, Developments in industrially important thermostable enzymes: a review, *Bioresour. Technol.* 89 (2003) 17–34, [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00033-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00033-6).
- [12] K. Ejima, J. Liu, Y. Oshima, K. Hirooka, S. Shimanuki, Y. Yokota, H. Hemmi, T. Nakayama, T. Nishino, Molecular cloning and characterization of a thermostable carboxylesterase from an archaeon, *Sulfolobus shibatae* DSM5389: non-linear kinetic behavior of a hormone-sensitive lipase family enzyme, *J. Biosci. Bioeng.* 98 (2004) 445–451.
- [13] M. Royter, M. Schmidt, C. Elend, H. Hobenreich, T. Schafer, U.T. Bornscheuer, G. Antranikian, Thermostable lipases from the extreme thermophilic anaerobic bacteria *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* SOL1 and *Caldanaerobacter subterraneanus* subsp. *Tengcongensis*, *Extremophiles* 13 (2009) 769–783.
- [14] X. Wang, X. Yu, Y. Xu, Homologous expression, purification and characterization of a novel high-alkaline and thermal stable lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416, *Enzyme Microb. Technol.* 45 (2009) 94–102.
- [15] C. Subathra Devi, V. Mohanasrinivasan, M. Chetna, A.S. Nikhil, S. Jemimah Naine, Thermostable lipase from novel *Pseudomonas* sp. VITSDVM1 isolated from bovine milk, *Front Life Sci.* 8 (2015) 165–171.
- [16] A. Sugihara, M. Ueshima, Y. Shimada, S. Tsunasaawa, Y. Tominaga, Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*, *J. Biochem.* 112 (1992) 598–603.
- [17] D.S. Dheeman, J.M. Frias, G.T.M. Henehan, Influence of cultivation conditions on the production of a thermostable extracellular lipase from *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304, *J. Ind. Microbiol. Biot.* 37 (2010) 1–17, <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-009-0643-7>.
- [18] P. Rathi, S. Bradoo, R.K. Saxena, R. Gupta, A hyper-thermostable, alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. with the property of thermal activation, *Biotechnol. Lett.* 22 (2000) 495–498, <http://dx.doi.org/10.1023/a:1005604617440>.
- [19] M.C. Kim, T.W. Jang, R. Harikrishnan, I.S. Jang, I.K. Yeo, J.B. Jeong, M.S. Heo, Identification and cultural characterization of lipase production bacteria isolated from pond effluent sedimentary layer, *Kor. J. Microbiol.* 45 (2009) 58–62.
- [20] Y. Yu, H. Li, Y. Zeng, B. Chen, Extracellular enzymes of cold-adapted bacteria from Arctic sea ice, *Can. Basin Polar Biol.* 32 (2009) 1539–1547.
- [21] D. Yuan, D. Lan, R. Xin, B. Yang, Y. Wang, Biochemical properties of a new cold-active mono- and diacylglycerol lipase from marine member *Janibacter* sp. strain HTCC2649, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 10554–10566.
- [22] K. Martin, P. Schumann, F.A. Rainey, B. Schuetze, I. Groth, *Janibacter limosus* gen. nov. sp. nov., a new *Actinomyces* with meso-diaminopimelic acid in the cell wall, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (1997) 529–534.

- [23] E. Stackebrandt, C. Scheuner, M. Goker, P. Schumann, The family *Intrasporangiaceae*, in: E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes: Actinobacteria*, Springer, Berlin Heidelberg, 2014, pp. 397–424, <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-30138-4> (Print ISBN 978-3-642-30137-7, Online ISBN 978-3-642-30138-4).
- [24] S.D. Schreck, A.M. Grunden, Biotechnological applications of halophilic lipases and thioesterases, *Appl. Microbiol. Biot.* 98 (2014) 1011–1021, <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-5417-5>.
- [25] J. Fu, H.K. Leiros, D. de Pascale, K.A. Johnson, H.M. Blencke, B. Landfald, Functional and structural studies of a novel cold-adapted esterase from an Arctic intertidal metagenomic library, *Appl. Microbiol. Biot.* 97 (2013) 3965–3978.
- [26] N. Lenfant, T. Hotelier, E. Velluet, Y. Bourne, P. Marchot, A. Chatonnet, ESTHER, the database of the  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions, *Nucleic Acids Res.* (2013) D423–D429, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1154>.
- [27] J. Sambrook, D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- [28] A. Amaro, E. Duarte, A. Amado, H. Ferronha, A. Botelho, Comparison of three DNA extraction methods for mycobacterium bovis, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Lett. Appl. Microbiol.* 47 (2008) 8–11, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765x.2008.02372.x>.
- [29] S. Das, J.C. Noe, S. Paik, T. Kitten, An improved arbitrary primed PCR method for rapid characterization of transposon insertion sites, *J. Microbiol. Meth.* 63 (2005) 89–94.
- [30] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede, The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling, *Bioinformatics* 22 (2006) 195–201, <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti770>.
- [31] N. Guex, M.C. Peitsch, SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis* 18 (1997) 2714–2723, <http://dx.doi.org/10.1002/elps.1150181505>.
- [32] T. Schwede, J. Kopp, N. Guex, M.C. Peitsch, SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server, *Nucl. Acc. Res.* 31 (2003) 3381–3385, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkg520>.
- [33] D.J. Ericsson, A. Kasrayan, P. Johansson, T. Bergfors, A.G. Sandstrom, J.E. Backvall, S.L. Mowbray, X-Ray structure of *Candida antarctica* lipase shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation, *J. Mol. Biol.* 376 (2008) 109.
- [34] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a New Generation of Protein Database Search Programs, 1997 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.
- [35] M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, D.G. Higgins, Clustal W and clustal x version 2.0, *Bioinformatics* 23 (2007) 2947–2948, <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>.
- [36] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T.J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, J.D. Thompson, D.G. Higgins, Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol. Syst. Biol.* 7 (2011) 539–545.
- [37] O. Emanuelsson, S. Brunak, G. von Heijne, H. Nielsen, Locating proteins in the cell using Target P Signal P, and related tools, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 953–971.
- [38] T.N. Petersen, S. Brunak, G. von Heijne, H. Nielsen, Signal P 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions, *Nat. Methods* 8 (2011) 785–786.
- [39] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura, MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Mol. Biol. Evol.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- [40] S. Whelan, N. Goldman, A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach, *Mol. Biol. Evol.* 18 (2001) 691–699.
- [41] T. Frickey, A. Lupas, CLANS: a Java application for visualizing protein families based on pairwise similarity, *Bioinformatics* 20 (2004) 3702–3704.
- [42] M. Mayer, J. Buchner, Refolding of inclusion body proteins, in: J. Decker, U. Reischl (Eds.), *Methods in Molecular Medicine: Molecular Diagnosis of Infectious Diseases*, 2nd edn., Humana Press Inc, Totowa, 2016, pp. 239–254.
- [43] A. Correa, C. Ortega, G. Obal, P. Alzari, R. Vincentelli, P. Oppezzo, Generation of a vector suite for protein solubility screening, *Front. Microbiol.* 5 (2014) 671–679.
- [44] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nat. Methods* 227 (1970) 680–685.
- [45] C. Giacomini, A. Villarino, L. Franco Fraguas, F. Batista Viera, Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 4 (1998) 313–327.
- [46] N. Prim, M. Sánchez, C. Ruiz, F.I.J. Pastor, P. Diaz, Use of methylumbelliferyl-derivative substrates for lipase activity characterization, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 22 (2003) 339–346.
- [47] P. Panizza, N. Syfantou, F.I.J. Pastor, S. Rodríguez, P. Diaz, Acidic lipase Lip I.3 from a *Pseudomonas fluorescens*-like strain displays unusual properties and shows activity on secondary alcohols, *J. Appl. Microbiol.* 114 (2013) 722–732.
- [48] A.T. Cornish-Bowden, *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, Portland Press, London, 1995.
- [49] S.P. Pawar, D.P. Dhotre, S.A. Shetty, S.P. Chowdhury, B.L. Chaudhari, Genome sequence of *Janibacter hoylei* MTCC8307, isolated from the stratospheric air, *J. Bacteriol.* 194 (2012) 6629–6630.
- [50] K.E. Jaeger, B.W. Dijkstra, M.T. Reetz, Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases, *Annu. Rev. Microbiol.* 53 (1999) 315–351.
- [51] P. Fojan, P.H. Jonson, M.T.N. Petersen, S.B. Petersen, What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach, *Biochimie* 82 (2000) 1033–1041, [http://dx.doi.org/10.1016/s0300-9084\(00\)01188-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0300-9084(00)01188-3).
- [52] A. Mitchell, H.Y. Chang, L. Daugherty, M. Fraser, S. Hunter, R. Lopez, C. McAnulla, C. McMenamin, G. Nuka, S. Pesseat, A. Sangrador-Vegas, M. Scheremetjew, C. Rato, S.Y. Yong, A. Bateman, M. Punta, T.K. Attwood, C.J. Sigrist, N. Redaschi, C. Rivoire, I. Xenarios, D. Kahn, D. Guyot, P. Bork, I. Letunic, J. Gough, M. Oates, D. Haft, H. Huang, D.A. Natale, C.H. Wu, C. Orengo, I. Sillitoe, H. Mi, P.D. Thomas, R.D. Finn, The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years, *Nucl. Acc. Res.* 43 (2015) D213–D221, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gku1243>.
- [53] A. Bassegoda, F.I.J. Pastor, P. Diaz, *Rhodococcus* sp. strain CR-53 Lipr the first member of a new bacterial lipase family (Family X) displaying an unusual Y-type oxyanion hole, similar to the *Candida antarctica* lipase clan, *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (2012) 1724–1732.
- [54] S. Shivaji, P. Chaturvedi, Z. Begum, P.K. Pindi, R. Manorama, D.A. Padmanaban, Y.S. Shouche, S. Pawar, P. Vaishampayan, C.B. Dutt, G.N. Datta, R.K. Manchanda, U.R. Rao, P.M. Bhargava, J.V. Narlikar, *Janibacter hoylei* sp. nov., *Bacillus isronensis* sp. nov. and *Bacillus aryabhatai* sp. nov., isolated from cryotubes used for collecting air from the upper atmosphere, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59 (2009) 2977–2986, <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.002527-0>.
- [55] T. Bisogno, F. Howell, G. Williams, A. Minassi, M.G. Cascio, A. Ligresti, I. Matias, A. Schiano-Moriello, P. Paul, E.J. Williams, U. Gangadharan, C. Hobbs, V. Di Marzo, P. Doherty, Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain, *J. Cell Biol.* 163 (2003) 463–468.
- [56] A. Côté, F. Shareck, Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Enzyme Microb. Tech.* 42 (2008) 381–388.
- [57] A.K. Das, J.J. Bellizzi, S. Tandel, E. Biehl, J. Clardy, S.L. Hofmann, Structural basis for the insensitivity of a serine enzyme (Palmitoyl-Protein thioesterase) to phenylmethylsulfonyl fluoride, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 23847–23851.
- [58] S. Dharmsthiti, J. Pratuangdejkul, G. Theeragool, S. Luchai, Lipase activity and gene cloning of *Acinetobacter calcoaceticus* LP009, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44 (1998) 139–145.
- [59] S. Falcochchio, C. Ruiz, F.I.J. Pastor, L. Saso, P. Diaz, Identification of a carboxylesterase-producing *Rhodococcus* soil isolate, *Can. J. Microbiol.* 9 (2005) 753–758.
- [60] Y. Zhang, K. Meng, Y. Wang, H. Luo, P. Yang, P. Shi, P. Wu, Y. Fan, J. Li, B. Yao, K. Meng, A novel proteolysis-resistant lipase from keratinolytic *Streptomyces fradiae* var. k11, *Enzyme Microb. Tech.* 42 (2008) 346–352.
- [61] M. Abramić, I. Lešćić, T. Korica, L. Vitale, W. Saenger, J. Pigac, Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*, *Enzyme Microb. Tech.* 25 (1999) 522–529, [http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229\(99\)00077-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229(99)00077-0).
- [62] J.K. Rao, P. Argos, Structural stability of halophilic proteins, *Biochemistry* 20 (1981) 6536–6543.