

**HIDRÓLISIS ENANTIOSELECTIVA DE (R,S)-MANDELATO DE METILO
CATALIZADA POR AGREGADOS ENZIMÁTICOS ENTRECruzADOS (CLEAs)
DE LIPASA DE *CANDIDA ANTARCTICA B.***

JENNIFFER CRUZ LAITÓN

**Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ciencias
Escuela de Química
Bucaramanga
2009**

**HIDRÓLISIS ENANTIOSELECTIVA DE (R,S)-MANDELATO DE METILO
CATALIZADA POR AGREGADOS ENZIMÁTICOS ENTRECruzADOS (CLEAs)
DE LIPASA DE *CANDIDA ANTARCTICA B***

JENNIFFER CRUZ LAITÓN

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Químico.

**RODRIGO TORRES SÁEZ –DIRECTOR-
CLAUDIA CRISTINA ORTIZ LÓPEZ –CODIRECTOR-**

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2009

AL SEÑOR JESÚS POR ILUMINAR MI VIDA CADA DÍA

A MIS PADRES POR DEDICAR SU VIDA A MI FORMACIÓN

***A MIS HERMANAS POR SU EJEMPLO Y ACOMPAÑAMIENTO AÚN EN
LEJANÍA***

***A ANDRÉS MAURICIO ESCORCIA Y A MI HIJO POR SER LA INSPIRACIÓN DE
MI VIDA***

A MI ABUELA LINA ROSA POR SER MI ÁNGEL GUARDIÁN

AGRADECIMIENTOS

A mi padre por ser ejemplo de vida.

A mi madre por su apoyo y voz de aliento cuando sentí desfallecer.

A mi familia por brindarme grandes alegrías

Al Dr. Rodrigo Torres Sáez por su aporte, dirección y orientación en el desarrollo de la tesis de grado.

A la Dra. Claudia Cristina Ortiz López por sus contribuciones.

A Luis Oveimar Barbosa por sus aportes durante el desarrollo de este trabajo.

A la profesora María Helena por aportarme sus conocimientos en la técnica de HPLC.

A Andrés Escorcía por su aporte y orientación en el desarrollo científico del trabajo, por su amor, compañía, apoyo, y por permitirme acompañarlo en el desarrollo de las etapas de su vida.

A mi gran amiga Yuri por compartir conmigo grandes momentos, a Jorge por su amistad y a mis demás amigos.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE FÍGURAS	11
INDICE DE ESQUEMAS	14
INDICE DE TABLAS.	15
ABREVIATURAS	17
LISTA DE ANEXOS	18
RESUMEN	19
ABSTRACT	20
INTRODUCCION	21
1 MARCO DE REFERENCIA	23
1.1 MARCO DE ANTECEDENTES	23
1.2 MARCO TEÓRICO	27
1.2.1 Métodos de inmovilización de enzimas.	27
1.2.2 Inmovilización por entrecruzamiento.	28
1.2.3 Entrecruzamiento de agregados enzimáticos (CLEA)	30
1.2.4 Estructura de los agregados entrecruzados enzimáticos.	33
1.2.5 Lipasa	35
1.2.6 Modulación de las propiedades catalíticas de las lipasas	37
1.2.6.1 Ingeniería del medio	37
1.2.6.2 Ingeniería del derivado	38
1.2.7 Interacción lipasa-Lipasa	39
1.2.8 Características físico-químicas de la Lipasa Candida Antarctica-B	41

1.2.9	Resolución cinética catalizada por lipasas	42
1.2.10	Enantioselectividad de las lipasas	43
1.2.11	Mandelato de metilo y producción del ácido 2-hidroxi- fenilacético (ácido mandélico).	45
1.2.12	Métodos para la determinación del exceso enantiomérico.	47
2	METODOLOGÍA	49
2.1	MATERIALES	49
2.2	ANÁLISIS DE PROTEINAS	49
2.2.1	Determinación de la concentración de proteína.	49
2.2.2	Determinación de la actividad enzimática de CAL-B	50
2.3	ELABORACIÓN DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS DE CAL-B.	50
2.3.1	Procedimiento para la elaboración de los agregados entrecruzados	50
2.3.2	Optimización del Agente Precipitante.	52
2.3.3	Optimización de la elaboración de agregados entrecruzados.	53
2.4	ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS PAGE-SDS PAGE.	53
2.5	EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS ELABORADOS BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS.	54
2.5	EFFECTO DEL pH PARA LA HIDRÓLISIS ENANTIOSELECTIVA DE MANDELATO DE METILO.	54

2.6	EFFECTO DE SOLVENTES ORGÁNICOS PARA LA HIDRÓLISIS ENANTIOSELECTIVA DE MANDELATO DE METILO.	55
2.7	ANÁLISIS POR HPLC	55
2.7.1	Determinación del exceso enantiomérico y la enantioselectividad.	56
3	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	57
3.1	ELABORACIÓN DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS DE CAL-B.	57
3.1.1	Optimización del Agente Precipitante.	57
3.1.2	Optimización de la fuerza iónica.	60
3.1.3	CLEAs con presencia de seroalbumina de bovino.	62
3.1.4	CLEAs en ausencia de seroalbumina de bovino.	66
3.1.5	Estructura de los agregados entrecruzados enzimáticos.	70
3.2	EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS DE CAL-B ELABORADOS BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS.	72
3.3	ESPECIFICIDAD DE LOS DISTINTOS CLEAs DE CAL-B	75
3.3.1	Efecto del pH	75
3.3.2	Efecto de la presencia de co-disolvente en el medio de reacción	76
3.4	EFFECTO DEL pH PARA LA HIDRÓLISIS ENANTIOSELECTIVA DE MANDELATO DE METILO.	77
3.5	EFFECTO DE SOLVENTES ORGÁNICOS PARA LA HIDRÓLISIS	78

ENANTIOSELECTIVA DE MANDELATO DE METILO.

CONCLUSIONES	80
RECOMENDACIONES	82
REFERENCIAS	83
ANEXO A	87
ANEXO B	88
ANEXO C	89
ANEXO D	90

ÌNDICE DE FÌGURAS

	Pág.
Figura 1	Métodos de inmovilización de enzimas 27
Figura 2	Diferentes enfoques en la inmovilización de enzimas libre de soporte: (a) cristalización; (b) agregación; (c);CSDE y disolución 28
Figura 3	Equilibrio entre las distintas conformaciones de lipasas en medios acuosos homogéneos. 30
Figura 4	Modulación de las propiedades catalítica a través de la Ingeniería del derivado. 33
Figura 5	Modulación de las propiedades catalíticas por ingeniería del medio de reacción. 34
Figura 6	Distintas conformaciones de lipasas 36
Figura 7	Resolución Cinética Catalítica 42
Figura 8	Resolución cinética catalizada por lipasa para un sistema reversible. 43
Figura 9	Reacción de hidrólisis del Mandelato de metilo 46
Figura 10	Diagrama de Pareto para las variables del proceso de elaboración de los agregados entrecruzados para la 59

optimización del agente precipitante.

Figura 11	Diagrama de Pareto en la optimización de los agregados entrecruzados de CAL-B en presencia de albumina	64
Figura 12	Superficie de respuesta en la optimización de los agregados entrecruzados de CAL-B en presencia de albumina	65
Figura 13	Contorno de superficie de respuesta en la optimización de los agregados entrecruzados de la CAL-B en presencia de albumina.	65
Figura 14	Diagrama de Pareto en la optimización de los agregados entrecruzados de CAL-B en ausencia de albumina	68
Figura 15	Superficie de respuesta en la optimización de los agregados entrecruzados de CAL-B en ausencia de albumina.	69
Figura 16	Contorno de superficie de respuesta en la optimización de los agregados entrecruzados de la CAL-B en ausencia de albumina.	69
Figura 17	Microscopía confocal del CLEA de CAL-B en ausencia de albumina.	70
Figura 18	Microscopía confocal del CLEA de CAL-B en presencia de albumina	70
Figura 19	Electroforesis SDS-PAGE de las preparaciones de la lipasa <i>Candida antarctica B</i> .	72

Figura 20 Estabilidad térmica. (■) enzima soluble; (●) CLEA sin albumina; (▲) CLEA con albumina. (A)T=70°C, (B)T=80°C y (C)T=90°C Los experimentos se desarrollaron como se indica en la parte experimental 73

ÌNDICE DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1 Activación interfacial de lipasas con interfases hidrofóbicas	37
Esquema 2 Equilibrio conformacional de las lipasas en medios acuosos homogéneos.	37
Esquema 3 Efecto de las condiciones experimentales en el mecanismo de apertura y cierre de la lipasa	39
Esquema 4 Diferentes metodologías de inmovilización	39
Esquema 5 Mecanismo propuesto para la agregación de lipasas	40
Esquema 6 Estructura molecular CAL-B. Tomado de Protein Data Bank, Software de visualización RASMOL.	42
Esquema 7 Ruta retrosintética de S-oxibutinina.	46
Esquema 8 Ruta retrosintética de (+)-Goniodiol	47
Esquema 9 Procedimiento para la elaboración de CLEAs	51

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Condiciones experimentales en la selección de variables significativas para la optimización de agente precipitante.	53
Tabla 2	Condiciones experimentales en la selección de variables significativas para la optimización de CLEAs.	53
Tabla 3	Matriz de resultados de la elaboración de los agregados entrecruzados en la optimización del Agente precipitante.	57
Tabla 4	Datos de ANOVA para la optimización del agente precipitante.	59
Tabla 5	Resultado de las actividades obtenidas de los CLEAS de CAL-B en ausencia de albumina a diferente fuerza iónica. Los CLEAs fueron elaborados a 4 °C y pH=7.0	61
Tabla 6	Resultado de las actividades obtenidas de los CLEAS de CAL-B en presencia de albumina a diferente fuerza iónica. Los CLEAs fueron elaborados a 4 °C y pH=7.0	61
Tabla 7	Matriz de resultados para los agregados entrecruzados de CAL-B en presencia de albumina.	62
Tabla 8	Contorno de superficie de respuesta para la elaboración de los agregados entrecruzados de la CAL-B para la	64

optimización del agente precipitante

Tabla 9	Matriz de resultados para los agregados entrecruzados de CAL-B en ausencia de albumina.	67
Tabla 10	Datos de ANOVA para la optimización del CLEA en ausencia de albumina.	68
Tabla 11	Constantes de inactivación térmica de los CLEAS óptimos de Cal-B.	74
Tabla 12	Actividad específica de los CLEAs de CAL-B catalizando la hidrólisis de pNPB y (R)-mandelato de metilo a 25°C a diferentes condiciones de pH	75
Tabla 13	Actividad específica de los CLEAs de CAL-B catalizando la hidrólisis de pNPB y (R)-mandelato de metilo a 25°C en diferentes solventes	76
Tabla 14	Enantioselectividad de los CLEAs óptimos de CAL-B en la hidrólisis de (±)- mandelato de metilo a 25°C y diferentes condiciones de pH.	77
Tabla 15	Enantioselectividad de los CLEAs óptimos de CAL-B en la hidrólisis de (±)- mandelato de metilo a 25°C y diferentes solventes orgánicos.	79

ABREVIATURAS

		Pág.
Asp	Ácido aspártico.	41
CAL-B	Lipasa <i>Candida Antarctica B</i>	24
CLEs	Entrecruzamiento enzimático en solución	23
CLEAs	Agregados enzimáticos entrecruzados	21
CLEC	Cristales de enzimas unidas por entrecruzamiento.	23
CSDE	Entrecruzamiento de enzima secada por aspersion.	28
DME	Dimetil éter	52
His	Histidina	41
p-NPB	<i>p</i> -Nitrofenilbutirato	49
SDS-PAGE	Dodecilsulfato de sodio en geles de poliacrilamida.	53
Ser	Serina	41

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A Curva de calibración para la determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford.	87
ANEXO B Curva de calibración para la cuantificación del grado de hidrólisis del Mandelato de metilo.	88
ANEXO C Cálculo de las constantes de inactivación térmica.	89
ANEXO D Cromatograma del (R,S)-Ácido mandélico ($t_R= 3.369$ min) y (R,S)-Mandelato de metilo ($t_R= 5.637$ min).	90

RESUMEN

TITULO: HIDRÓLISIS ENANTIOSELECTIVA DE (R,S)-MANDELATO DE METILO CATALIZADA POR AGREGADOS ENZIMÁTICOS ENTRECruzADOS (CLEAs) DE LIPASA DE CANDIDA ANTARCTICA B[†].

Cruz, Jenniffer; Ortiz, Claudia y Torres Rodrigo**.

Palabras claves: *Agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs), ingeniería conformacional, lipasa CAL-B, diseño experimental; (RS)-Mandelato de metilo.*

El diseño de métodos eficientes para acceder a compuestos quirales es de especial interés en la química orgánica. Uno de los métodos utilizados para este propósito es la resolución cinética catalizada por lipasas; estas enzimas son el grupo de biocatalizadores más versátiles en síntesis orgánica.

En este trabajo se llevó a cabo una optimización para obtener agregados entrecruzados de lipasa de *Candida antarctica* B (CLEAs de CAL-B) en presencia y ausencia de "albúmina de suero bovino" (BSA), utilizando un diseño experimental factorial multinivel para evaluar el efecto de la concentración de proteína, de diferentes agentes precipitantes (t-butanol, sulfato de amonio y dimetiléter), y de glutaraldehído (agente entrecruzante), sobre la actividad enzimática de CAL-B. La mayoría de los agregados entrecruzados mostraron un incremento significativo de la actividad específica de la CAL-B, el CLEA óptimo obtenido en ausencia de albúmina presentó una hiperactivación enzimática del 1037%, y el CLEA óptimo en presencia de albúmina una hiperactivación enzimática del 296,25%.

Tanto el CLEA óptimo con y sin albúmina, fueron utilizados en la hidrólisis de (RS)-mandelato de metilo bajo diferentes condiciones de pH (5, 6, 7 y 8), y en presencia de distintos solventes orgánicos (al 10% v/v) en el medio de reacción (etanol, isopropanol, butanol y t-butanol). El CLEA sin albúmina resultó ser el más activo en la mayoría de las condiciones de pH, además de ser el más enantioselectivo (E=192, pH 5) permitiendo obtener el R- ácido mandélico con un ee del 99%. Cuando se trabajó en presencia de solventes orgánicos en el medio de reacción, se obtuvieron los mejores resultados - con ambos CLEAs - en presencia de t-butanol, alcanzando el CLEA con BSA un E= 435 y el CLEA sin BSA un E=233, obteniéndose en ambos casos el S-ácido mandélico con un ee del 99%.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Rodrigo Torres Sáez.

ABSTRACT

TITLE: ENANTIOSELECTIVE HYDROLYSIS OF (R,S)- METHYL MANDELATE CATALYZED BY CROSS-LINKED ENZYME AGGREGATES (CLEAs) OF LIPASE FROM *CANDIDA ANTARCTICA B.**

Cruz, Jenniffer; Ortiz, Claudia y Torres Rodrigo**.

Keywords: *Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs), Conformational engineering, CAL-B lipase, experimental design, (R,S)-methyl mandelate.*

The design of efficient methods for accessing chiral compounds is of particular interest in organic chemistry. One of the methods used for this purpose is the kinetic resolution catalyzed by lipases; these enzymes are the most versatile group of biocatalysts in organic synthesis.

This work was carried out to obtain an cross-linked enzyme aggregates optimization of lipase *Candida antarctica B* (CAL-B CLEAs) in the presence and absence of "bovine serum albumin" (BSA), using a multilevel factorial experimental design to evaluate the effect of the concentration of protein and precipitating agents (t-butanol, ammonium sulphate and dimethylether) and glutaraldehyde (cross-linking agent), on the enzymatic activity of CAL-B. Most of cross-linked aggregates showed a significant increase in the specific activity of optimal CAL-B-CLEA obtained in the absence of albumin introduced an enzyme hyperactivation of 1037% and the optimal CLEA albumin in the presence of an enzyme hyperactivation of 296.25%.

Both optimal CLEA – with and without albumin - were used in the hydrolysis of (RS)-methyl mandelate under different pH conditions (5, 6, 7 y 8) and in the presence of various organic solvents (at 10% v/v) in the reaction medium (ethanol, isopropanol, butanol and t-butanol). The CLEA without albumin was the most active in most of pH conditions, being also the most enantioselective ($E = 192$, pH 5) obtaining the R-mandelic acid with an ee of 99%. When it was worked with the presence of organic solvents in the reaction, the best results were obtained with both CLEAs in the presence of t-butanol, obtaining an $E = 435$ with CLEA with BSA and an $E = 233$ without BSA, resulting in both cases the S- mandélico acid with an ee of 99%.

* Degree Work

** Faculty of Science, School of Chemistry, Director: Rodrigo Torres Sáez.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos que promueven la transformación de una especie química y pueden catalizar reacciones en diferentes estados: como moléculas individuales en solución, en agregados con otras entidades y sujetas a superficies (enzimas inmovilizadas). El término “inmovilización de enzimas”, se refiere a enzimas físicamente confinadas o localizadas en una región definida con retención de sus actividades catalíticas, que pueden ser usadas continuamente y repetidamente, permitiéndole una mayor estabilidad térmica y actividad catalítica. Éstos procesos de inmovilización han tenido grandes aplicaciones en industrias farmacéutica, química y de textiles, como en la producción industrial de azúcares y ácidos grasos.

La viabilidad económica en la conversión biocatalítica frecuentemente depende en encontrar un método efectivo para la inmovilización de la enzima. El entrecruzamiento entre agregados enzimáticos (CLEAs) constituye una metodología efectiva para la inmovilización de enzimas con amplio alcance. Los resultados con CLEAs son enzimas estables, exhibiendo una alta retención de la actividad en muchos casos más alto que el de la enzima nativa, de donde se derivan, esta hiperactivación es debida al cambio conformacional de la proteína inducida por el estado agregado. La enzima no necesita ser de alta pureza desde la metodología de purificación esencialmente combinada y la inmovilización se realiza dentro de una sola operación. Éstos agregados físicos son estructuras supramoleculares sujetas por enlaces no covalentes y redisueltas cuando se dispersan en agua.

Las lipasas son enzimas con un gran interés en química orgánica ya que presentan una amplia especificidad por sustratos muy diferentes, lo cual contrasta, en algunos casos, con una elevada regio y enantioselectividad. Estas propiedades han convertido a las lipasas en las enzimas con mayor uso en biotransformaciones, por ejemplo en resolución de mezclas racémicas.

En medios acuosos homogéneos, la lipasa cristaliza con el centro activo totalmente aislado del medio de reacción por una cadena polipeptídica, llamada *tapadera* o *lid* haciendo inaccesible la entrada de los sustratos (conformación cerrada). Esta cadena polipeptídica presenta en su cara interna una serie de residuos hidrofóbicos que interaccionan con las zonas hidrofóbicas que rodean al sitio activo de las lipasas. Sin embargo, cuando la enzima se cristaliza en presencia de sustratos de gran tamaño, se obtiene una conformación totalmente distinta, lo que se denomina lipasa abierta.

Parece evidente que cualquier cambio en las condiciones del medio puede alterar de forma significativa todo el balance de interacciones: los disolventes favoreciendo el bolsillo hidrofóbico y fortaleciendo las interacciones electrostáticas, el pH alterando el tipo y cantidad de interacciones entre el lid y el resto de la superficie de la proteína, la fuerza iónica haciendo más desfavorable la presencia del bolsillo hidrofóbico y debilitando las interacciones del lid con el resto de la proteína, etc. De esta forma, las condiciones experimentales deberían de afectar de forma dramática no solo al equilibrio entre la conformación abierta y cerrada de la lipasa, sino también a la forma exacta del centro activo y por lo tanto, a sus propiedades catalíticas.

1. MARCO DE REFERENCIA

1.1 MARCO DE ANTECEDENTES.

La técnica de entrecruzamiento de proteína vía reacción del glutaraldehído con los grupos amino reactivos en la superficie de proteína fue inicialmente desarrollada en los años sesenta (Doscher y Richards, 1963). Sin embargo, este método de producción de enzimas entrecruzadas (CLEs) tuvo varios inconvenientes, tales como la baja retención de actividad, pobre reproducibilidad, baja estabilidad mecánica y dificultades en el manejo de los CLEs gelatinosos.

En el año 1964 Quijoch y Richards utilizaron el entrecruzamiento con glutaraldehído de una enzima cristalina (CLECs) para estabilizar los cristales de la enzima mediante estudios de DRX, pero también la actividad catalítica fue retenida. Los CLECs fueron introducidos comercialmente en la industria de la biocatálisis alrededor de los 90s (Haring y Schreier, 1999), aunque una desventaja de éstos fue la necesidad que la enzima cristalina en los procedimientos de laboratorio requería una alta pureza¹.

En el año 2000, Cao et al. encontraron resultados favorables precipitando la enzima y entrecruzando el resultado con un agregado físico, dejando al descubierto una nueva forma de inmovilización de enzimas: Entrecruzamiento de agregados enzimáticos (CLEAs). Cao y col., inmovilizaron la enzima *penicilina acilasa* a través del entrecruzamiento con glutaraldehído, tal que estos agregados

¹ Sheldon, R.A.; Schoevaart, R.; et al. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, (87:6), 754-762.

entrecruzados de *penicilina acilasa* catalizaron la síntesis de ampicilina en un amplio rango de solventes orgánicos, manteniendo su actividad catalítica intacta².

Ese mismo año (2000), Mateo y colaboradores³ inmovilizaron diferentes enzimas sobre soportes epóxidos multifuncionales, proponiendo este tipo de inmovilización como una herramienta útil para mejorar la inmovilización covalente de proteínas.

En el año 2001, Cao y col., reportaron la inmovilización de la *penicilina G Acilasa* adicionando diferentes agentes precipitantes, como sulfato de amonio, polietilenglicol o butanol, ocasionando la agregación de la proteína y usando el glutaraldehído como agente entrecruzante. Los resultados obtenidos mostraron que el butanol permitía una retención mayor de la actividad en comparación con los agregados elaborados con polietilenglicol y sulfato de amonio; estos agregados entrecruzados elaborados con butanol fueron utilizados como catalizadores en la síntesis de antibióticos β - lactámicos, mostrando actividades catalíticas superiores en comparación con la penicilina-G-acilasa inmovilizada.⁴

Posteriormente, Palomo y col. (2002)⁵, modificaron las propiedades de actividad y enantioselectividad de la lipasa *Candida antarctica B* (CAL-B) mediante herramientas de ingeniería conformacional. Esta lipasa fue inmovilizada en soportes poliméricos activados con diferentes grupos funcionales para interactuar con los aminoácidos superficiales de las lipasas. Cada derivado inmovilizado presentó diferente actividad y enantioselectividad al catalizar la hidrólisis de un compuesto aquiral y dos compuestos quirales bajo diferentes condiciones de reacción.

² Cao, L.; Van Rantwijk; Sheldon, R.A.; Organic letters. **2000** (2:10), 1361-1364.

³ Mateo, C.; Fernández-Lorente, G.; Abian, A.; et al. *Biomacromolecules*. **2000**, (1), 739-745.

⁴ Cao, L.; Van Rantwijk, F.; Sheldon, R.; Van Langen, L.J. *of mol. catalysis B: Enzymatic* **2001**, 665-670.

⁵ Palomo, J.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C; et al. *Enzyme and Microbial Technology*. **2002**, (31), 775-783

En ese mismo año, Lopez-Serrano, Cao y Van Rantwijk ⁶, precipitaron las lipasas de *Thermomyces lanuginosus* y *Rhizomucor miehei* con sulfato de amonio en presencia de Triton X-100 como surfactante, con un posterior entrecruzamiento con glutaraldehído. La actividad catalítica de los CLEAs elaborados fue evaluada en la hidrólisis del propionato de *p*-nitrofenilo, mostrando actividades similares a la enzima soluble, e incluso en algunos casos actividades superiores.

Moira y Van Rantwijk⁷, en el 2003, elaboraron agregados entrecruzados de aminoacilasa de *Aspergillus melleus* y determinaron su actividad en la aminólisis y alcoholólisis de sustratos quirales. Los CLEAs elaborados mostraron actividades superiores a la de la enzima soluble en las reacciones de aminólisis y alcoholólisis en las que fueron utilizados.

En el 2004, Schoevaart, Sheldon y col.⁸, elaboraron agregados entrecruzados de 12 enzimas diferentes, entre las que se encuentran la galactosa oxidasa, glucosa oxidasa, lacasa, lipasa, entre otras. En ese trabajo los investigadores evaluaron el efecto de 14 agentes precipitantes (metanol, etanol, acetona, PEG, entre otros) y de la concentración de glutaraldehído como agente entrecruzante en la formación de los agregados físicos entrecruzados de estas enzimas.

También en este año, Wilson, Betancor y otros⁹, publicaron los resultados obtenidos en la elaboración de agregados entrecruzados de enzimas multiméricas como las catalasas de hígado de bovino (BLC) y *Micrococcus lysodikticus* (MLE). Determinaron que los CLEAs elaborados presentaban una alta estabilidad bajo

⁶ Cao, L.; Van Rantwijk, F.; Sheldon, R.; Lopez-Serrano, P. *Biotechnology letters*. **2002**, (24), 1379-1383.

⁷ Moira, L.; Van Rantwijk, F.; Sheldon, R. *Biotechnol. Bioeng.***2003**, (84:6).

⁸ Referencia 2.

⁹ Wilson, L.; Betancor, L.; Fernandez-Lorente, M. *Biomacromolecules*. (**2004**) (5:3)

condiciones de dilución e interesantemente estabilizaban la estructura multimérica de estas enzimas tetraméricas.

En el año 2005, Fernández-Lorente y col.¹⁰, purificaron diferentes lipasas de *Aspergillus niger* utilizando adsorción interfacial selectiva de lipasas sobre soportes hidrofóbicos. Con estos derivados se obtuvo el enantiómero S del ácido 2-fenil-2-butiliról etanoico con una pureza mayor del 99% y una enantioselectividad mayor de 100.

Siti Salhah Othman y col.¹¹. (2008), lograron una producción altamente enantioselectiva de (-)-butirato de mentilo utilizando lipasa de *Candida rugosa* (CRL) inmovilizada en soportes activados con grupos epóxidos. El compuesto mencionado fue obtenido con una pureza del 100% con la CRL inmovilizada en soportes epóxidos de Eupergit C.

Escorcía y col.¹², realizaron la resolución cinética de (R,S) Mandelato de Metilo utilizando la Lipasa de *Candida antarctica B* (CAL-B), que fue purificada e inmovilizada covalentemente sobre soportes epóxido multifuncionales. Los resultados obtenidos mostraron que el derivado octil-agarosa-CALB fue el más activo, aunque poco enantioselectivo en comparación con otros derivados. Se destacó el derivado EC-amino-CAL-B, el cual fue altamente enantioselectivo a pH 8 (E=52), permitiendo obtener el enantiómero R del ácido mandélico con un ee del 96%.

Wilson, L. et al.¹³. elaboraron CLEAs de *penicilina acilasa* cubiertos con polietilendiamina y dextrano sulfato utilizando diferentes agentes entrecruzantes.

¹⁰ Fernández Lorente, G.; Ortiz, C.; Segura, R.; et al. *Wiley Periodicals, Inc.* **2005**, 773-779

¹¹ Othman, S.; Basri, M.; Hussein, M.; et al. *Food Chemistry.* **2008**, 106, 437-443.

¹² Escorcía, A.; Torres, R.; Ortiz, C.. Resolución cinética de (R,S)-mandelato de metilo utilizando preparaciones inmovilizadas de lipasa de *candida antártica B.* **2008**.

¹³ Wilson L, Illanes A, Soler L, Henriquez MJ, *Process Biochemistry.***2008**, (10),1-19

Los mejores resultados se obtuvieron con CLEAs en un 0,15 a razón de glutaraldehído/enzimas proteína, la actividad específica de la hidrólisis y la síntesis fue de 708 y 325 U/g_{CLEA} respectivamente, y la conversión fue de un 87% de rendimiento.

1.2 MARCO TEÓRICO.

1.2.1 Métodos de inmovilización de enzimas.

Conceptualmente, los métodos de inmovilización de enzimas son divididos en tres tipos: i) inmovilización en soportes (formación de enlaces), ii) inmovilización en un gel polimérico orgánico e inorgánico (encapsulamiento) y iii) inmovilización libre de soporte (entrecruzamiento de las moléculas de proteínas). Estos tres tipos pueden además ser subdivididos de acuerdo con la técnica utilizada para llevar a cabo cada proceso de inmovilización como se muestra en la **Fig.1**.

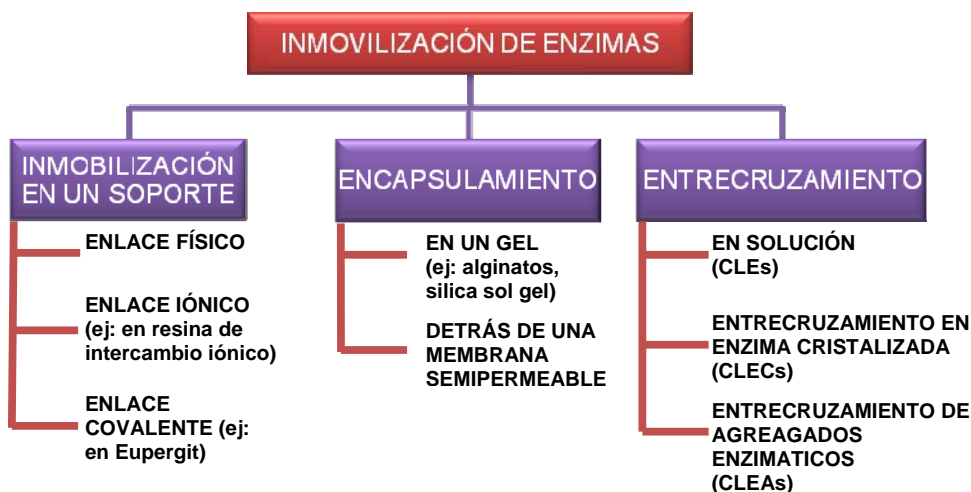


Fig.1 Métodos de inmovilización de enzimas

Entre los métodos de inmovilización mencionados anteriormente, la inmovilización en soportes y el encapsulamiento presentan una desventaja

inherente como es la disminución de la actividad catalítica debido a la introducción de una gran proporción de masa no catalítica, alrededor del 90 al 99% de masa total¹⁴. Por el contrario, la técnica de inmovilización a través del agregamiento de enzimas y posterior entrecruzamiento en ausencia de soportes, ha presentado aumentos tanto en actividad catalítica así como en su estabilidad térmica y frente a solventes orgánicos.

1.2.2 Inmovilización por entrecruzamiento.

La inmovilización libre de soporte no necesita una masa inactiva extra como transportador. Diferentes estrategias de entrecruzamiento han sido reportadas entre las cuales se encuentran el entrecruzamiento de enzimas en disolución (CLEs), enzima cristalina (CLECs), enzima secada por aspersion (CSDEs) y enzimas agregadas físicamente (CLEAs), como se ilustra en la **Fig.2**¹⁵.

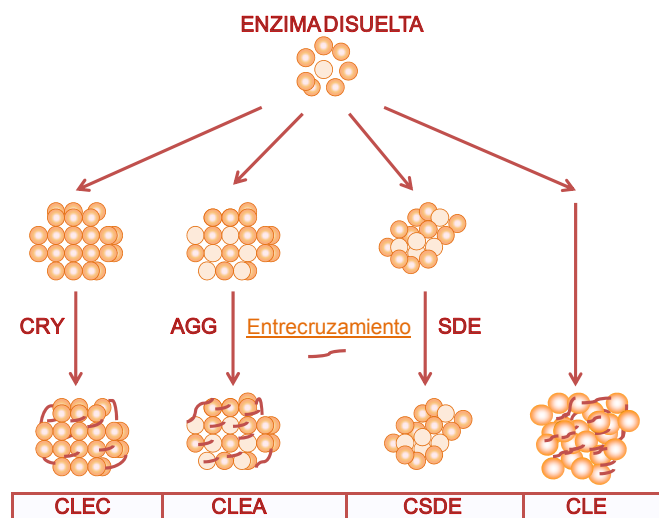


Fig.2 Diferentes enfoques en la inmovilización de enzimas libre de soporte: (a) cristalización; (b) agregación; (c) secado por aspersion; (d) enzima en solución.

¹⁴ Cao, L.; Van Langen, L.; Sheldon, R. *Curr opin Biotechnol.* **2004**, (14:4), 387-394

¹⁵ Amotz, S. *Novo Industry A/S.* **1987**, (4), 664-665

La técnica de entrecruzamiento de proteína por la reacción del glutaraldehído con grupos amino (NH₂) reactivos en la superficie de proteína fue inicialmente descubierta en 1960¹⁶. Sin embargo, este método para producir enzimas entrecruzadas (CLECs) tuvo varios inconvenientes, tales como baja retención de actividad, pobre reproducibilidad, baja estabilidad mecánica y dificultades en el manejo de los CLECs gelatinosos. La estabilidad mecánica y la facilidad de ser manipulados pudo ser mejorada mediante entrecruzamiento de la enzima en un gel matriz o transportador, pero esto a su vez conllevó a una dilución de la actividad catalítica. Consecuentemente, finalizando los años sesenta, se hizo énfasis en las enzimas enlazadas, metodología que llegó a ser la más utilizada industrialmente para la inmovilización de enzimas en las próximas tres décadas.

El entrecruzamiento de la enzima cristalina con glutaraldehído fue descubierto por Quioco y Richards en 1964¹⁷, el principal objetivo fue la estabilización de la enzima cristalina por estudios de DRX, pero también mostró que la actividad catalítica fue retenida. El uso del entrecruzamiento de los cristales de enzima (CLECs) como biocatalizador industrial fue implantado por científicos de "Vertex Pharmaceuticals" iniciando los años noventa y consecuentemente comercializado por "Altus Biologics"¹⁸. Los estudios iniciales fueron desarrollados con CLECs de termolisina, de interés en la manufactura del ácido aspártico, pero el método fue subsecuentemente aplicado para un rango de enzimas. Los CLECs mostraron significativamente una mayor estabilidad a la desnaturalización por calentamiento, solventes orgánicos y proteólisis, en comparación con la correspondiente enzima soluble o en polvo liofilizado. A pesar que los CLECs son fuertes una inherente desventaja de la cristalización de la enzima, es que frecuentemente es un procedimiento altamente laborioso requiriendo que la enzima se encuentre altamente pura¹⁹

¹⁶ Doscher, M.S. and Richards, F.M.J. *Biol. Chem.*, **1963**, (238), 2399–2406,

¹⁷ Quioco, F.A. and Richards, F.M., *Proc. Natl. Acad. Soc. USA*, **1962**, (114), 7314–7316.

¹⁸ St.Clair, N.L. and Navia, M.A., *J. Am. Chem.Soc.*, **1992**, (114), 7314–7316,

¹⁹ Margolin, A.L., *Novel crystalline catalysts, Tibtech.*, **1996**,(14), 223–230,

1.2.3 Entrecruzamiento de agregados enzimáticos (CLEA)

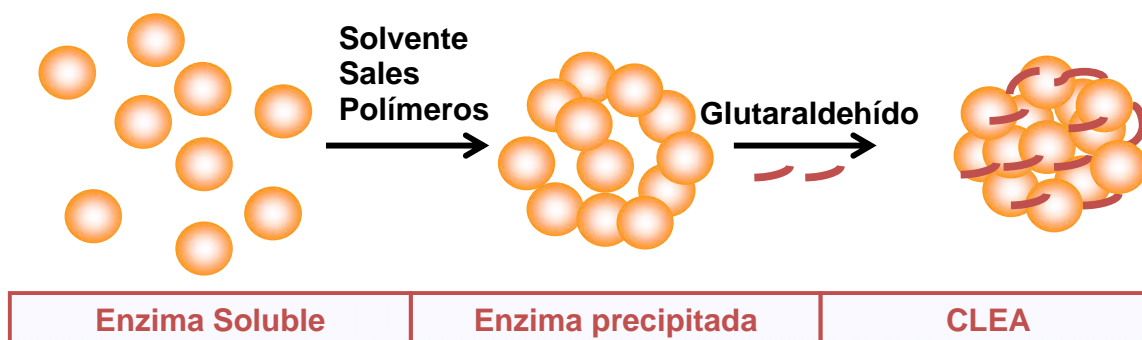


Fig.3 Métodos de entrecruzamiento de agregados enzimáticos

Recientemente se desarrolló una nueva forma de inmovilización de enzimas, llamada entrecruzamiento de agregados enzimáticos (**CLEA**). Esta técnica consta de una etapa de precipitación y agregación de la enzima, la cual es inducida por la adición de sales, solventes orgánicos, polímeros no iónicos y ácidos. Esta etapa de precipitación es comúnmente utilizada como método de purificación de proteínas²⁰. Estos agregados físicos son estructuras supramoleculares unidas por enlaces no covalentes, las cuales pueden ser redisueltas cuando son dispersadas en agua. La formación de estos agregados físicos es posible debido a un cambio en el estado de hidratación de las moléculas de la enzima, o por la alteración de la constante electrostática de la solución debido a la adición de un agente de agregación o precipitación apropiado²¹.

Investigaciones recientes muestran que para concentraciones altas de precipitante los resultados obtenidos son muy buenos, lográndose un rendimiento del 100% en la actividad catalítica. Una razón para esta alta retención de la actividad es la competencia entre agregación y desnaturalización. Por el contrario,

²⁰ Referencia 2

²¹ Referencia 15

concentraciones menores del 70% v/v mostraron inactivaciones parciales debido a que la precipitación es incompleta.

Durante la etapa de agregación la solubilidad de la enzima en el medio circundante decrece. Cuando este proceso de agregación disminuye, la enzima puede desnaturalizarse por causa de una gran fuerza ejercida sobre su estructura. Las observaciones anteriormente mencionadas sugieren que la formación del agregado insoluble de la enzima constituye una etapa esencial para la retención de la actividad enzimática durante el entrecruzamiento, por lo que se hace necesaria la selección adecuada del agente precipitante.

La siguiente etapa es la de entrecruzamiento del agregado físico. Este proceso consiste básicamente en la formación de enlaces covalentes entre los grupos reactivos del agente bifuncional y los residuos aminoacídicos de la enzima, principalmente lisina. En esta etapa se mantienen la estructura del agregado y la actividad catalítica de la proteína individual. De forma interesante, el rendimiento de la actividad del agregado enzimático entrecruzado excede al de la enzima nativa. Este hecho experimental ha sido observado con lipasas y posteriormente con otras enzimas, y se denomina hiperactivación, la cual puede ser originada por un cambio conformacional de la proteína inducido por el estado de agregación²².

Se conocen varios agentes entrecruzantes, sin embargo, por su precio económico y alta versatilidad química el **glutaraldehído** es el más utilizado. Éste es el agente entrecruzante más efectivo de proteínas, debido en gran medida a las variadas estructuras que puede tomar en solución acuosa, lo que le permite bajo determinadas condiciones de pH, temperatura y concentración, reaccionar con ciertos grupos funcionales de residuos aminoacídicos de las proteínas, tales como amino, tiol, fenol e imidazol, ya que el lado de la cadena más reactiva de los aminoácidos son nucleófilos.

²² Referencia 2

La reactividad mostrada por los aminoácidos en orden decreciente frente a los aldehídos es: ϵ -amino, α -amino, guanidilo, amina secundaria y grupos hidroxilos. El glutaraldehído reacciona reversiblemente con grupos amino en un rango de pH entre 7 – 9, donde la reversibilidad observada es pequeña. El entrecruzamiento de proteínas con soporte (soporte sólido) o entre moléculas de proteínas (libre de soporte), generalmente implica los grupos ϵ -amino de residuos de lisina.

Los grupos amino desprotonados son muy reactivos como agentes nucleofílicos, esto se debe a que los grupos ϵ -amino de lisina tienen $pK_a > 9.5$, lo que supone que el pequeño porcentaje de amina presente en su forma desprotonada con un pH bajo pueda conducir al equilibrio ácido-base para la desprotonación de estos grupos, con lo que se promueve la reacción.

Los residuos de lisina generalmente no comprometen el sitio activo catalítico, el cual permite el entrecruzamiento moderado para preservar la conformación de la proteína y su actividad biológica. El grupo ϵ -amino de los residuos de lisina de las proteínas reaccionan con los aldehídos formando bases de Schiff a través de un ataque nucleofílico del grupo amino al carbono carbonilo del aldehído. Sin embargo, las bases de Schiff no son estables bajo condiciones ácidas y tienden a regenerar el aldehído y la amina. En contraste, el enlace formado por la reacción del glutaraldehído con un grupo amino mostró estabilidad excepcional para pH y temperaturas extremas. Estas bases de Schiff simples, con ambos extremos de glutaraldehído monomérico pueden ser utilizadas como un mecanismo para el entrecruzamiento de proteínas.

Se han propuesto diversas alternativas de mecanismos de reacción de formación, entre ellos el de Richards y Knowles, en el cual el glutaraldehído y el grupo ϵ -amino del residuo de lisina interactúan a través de una reacción de tipo Michael, como se puede observar en la reacción 2 de la figura 4. Posteriormente,

surgió un mecanismo ligeramente diferente, en el cual una reacción de adición ocurría sobre la parte aldéhdica del polímero α - β -insaturado (poli- glutaraldehído) para originar una base de Schiff (imina) estabilizada por conjugación, la cual se presenta en la Figura 4 (reacción 1).

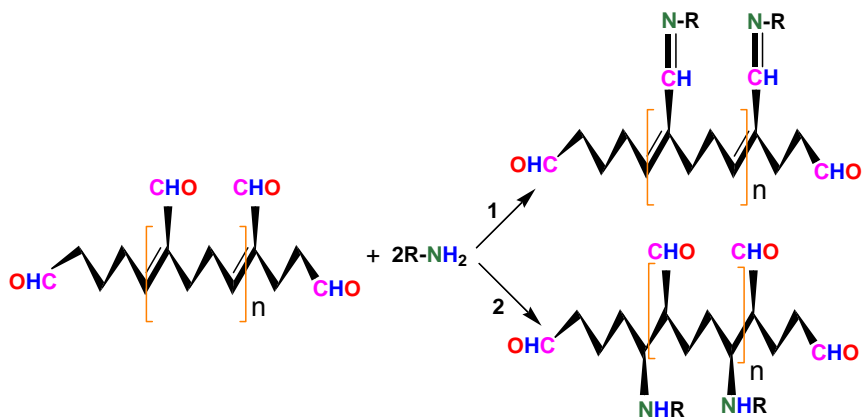


Fig.4 Reacciones del glutaraldehído con proteínas.

Bajo condiciones de pH ácidas o neutras el glutaraldehído se presenta como una mezcla de monómeros y como un polímero, cada una de estas estructuras puede formar bases de Schiff a través de un ataque nucleofílico por los residuos de lisina en la proteína, como se muestra en la figura 5²³.

1.2.4 Estructura de los agregados entrecruzados enzimáticos.

Diferentes agregados de enzimas han sido estudiados utilizando microscopía de barrido electrónico (SEM), sobresaliendo dos tipos:

- **Agregado tipo 1 (bolas)**

Este tipo de agregados tiene una forma típica de “bolas”. Se han encontrado en enzimas escasamente glicosiladas y altamente lipofílicas. Agregados de este tipo se produjeron en la lipasa de *Candida antártica B*. El diámetro de este tipo de agregados es aproximadamente de 1 μ m. Cada partícula sencilla de CLEA

²³ Migneault, I.; Dartiguenave, C. “. *Biotechniques*. **2004**, (37), 790-802.

contenía un máximo de 8×10^6 moléculas de enzima. La actividad enzimática en este tipo de “bolas” no solo es fuertemente retenida, sino que pueden presentar un estado de hiperactivación reflejado por actividades que exceden el 100% de la enzima en forma soluble.

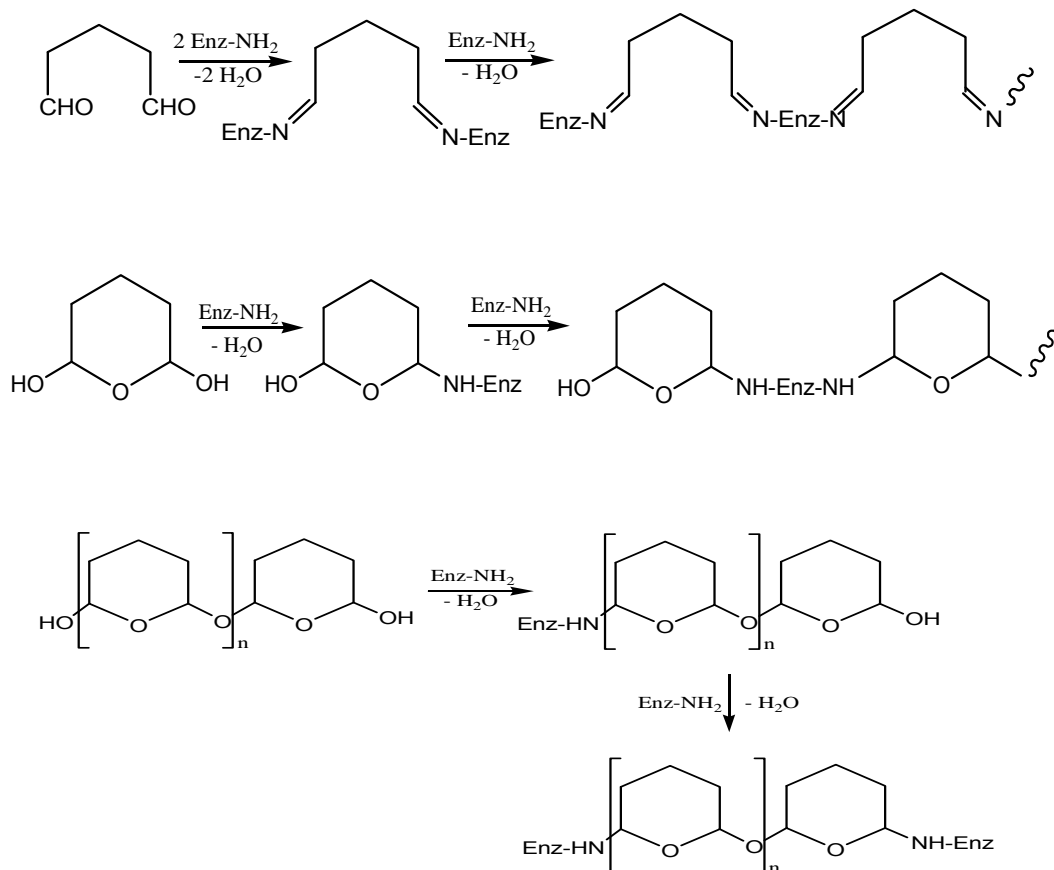


Figura 5. Reacciones del glutaraldehído con proteínas bajo condiciones ácidas y neutras

• **Agregado tipo 2 (Ramificaciones o “cluster”)**

Estos agregados presentan diámetros de aproximadamente 0.1 μm y forman ramificaciones. La lipasa de *Candida rugosa* y la R-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus* son ejemplos de este tipo de agregados. Estas enzimas son glicosiladas y por consiguiente tienen una superficie más hidrofílica. Una partícula

de CLEA de estos agregados puede contener un máximo de 8×10^3 moléculas de enzima²⁴.

1.2.5 Lipasa

Las lipasas son enzimas hidrolíticas (triacilglicerol hidrolasas, EC 3.1.1.3) que actúan sobre triglicéridos insolubles y otros ésteres insolubles de ácidos grasos de cadena larga²⁵. Las lipasas son enzimas con un gran interés en química orgánica ya que presentan una amplia especificidad por sustratos muy diferentes, lo cual contrasta en algunos casos con una elevada regio- y enantio- selectividad²⁶⁻²⁷. Estas propiedades han convertido a las lipasas en las enzimas con mayor uso en biotransformaciones como por ejemplo en la resolución de mezclas racémicas²⁸. Además, puesto que la reacción de hidrólisis es reversible, estos biocatalizadores pueden también catalizar la formación de ésteres a partir de donadores acilo y alcoholes en sistemas no acuosos²⁹.

Sin embargo, a la hora de utilizar las lipasas como catalizadores, es necesario considerar algunas peculiaridades de su mecanismo de acción. En este contexto, mediante técnicas cristalográficas, se han obtenido dos conformaciones diferentes de lipasas: abierta y cerrada. Así, en medios acuosos homogéneos, la lipasa cristaliza con el centro activo cubierto por una cadena polipeptídica, llamada tapadera³⁰ (flat o lid) (**Fig.6**), lo cual hace que la enzima sea inaccesible a los sustratos (conformación cerrada). Sin embargo, cuando la enzima es cristalizada en presencia de sustratos o estructuras hidrofóbicas, se obtiene la conformación abierta de la lipasa (forma activa), en la cual la tapadera se encuentra desplazada del sitio activo, interaccionando por medio de puentes salinos, puentes de

²⁴ Referncia 2

²⁵ Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R. *Chemistry and Physics of Lipids*. **1998**, 93, 67-80.

²⁶ Sarda, L. ; Desnuelle, P. *Biochim. Biophys. Acta*. **1958**,30, 513-521

²⁷ Reetz, M. T.; Rüggeberg, C. J.; Dröge, M. J.; Quax, W. J. *Tetrahedron*. **2002**, 58, 8465-8473.

²⁸ Sobolev, A.; Franssen, M.C.R.; Poikans, J.; Duburs, G.;de Groot, *Tetrahedron*.**2002**,(13), 2389-2397.

²⁹ Chen, C.-S.; Wu, S.-H.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 2812-2817.

³⁰ Segundo, F.; Carrea, G.; Tarabiono, C.; et al. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*. **2006**, 39, 166-170.

hidrógeno, etc. con otra zona de la superficie de lipasa, dejando de esta manera el sitio activo libre y accesible al medio de reacción.

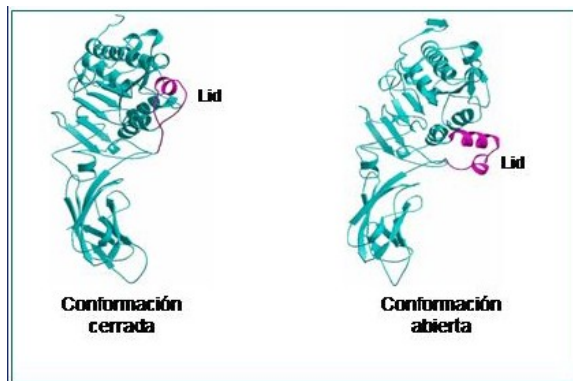


Figura 6. Distintas conformaciones de lipasas.

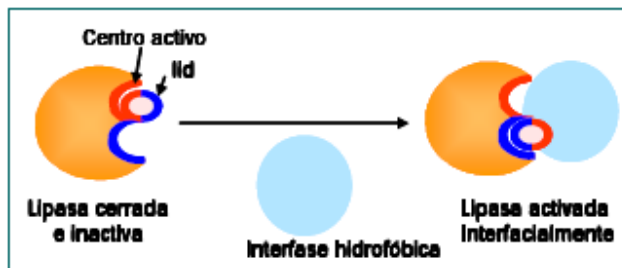
Estos datos han permitido establecer que en el mecanismo catalítico de las lipasas ocurre lo que se denomina activación interfacial de lipasas³¹. Según esta propuesta, en sistemas homogéneos las lipasas se encuentran en una conformación cerrada, con el centro activo bloqueado, las cuales en presencia de interfases hidrofóbicas se adsorben a la misma desplazando la “tapadera” y originando la conformación abierta. Este mecanismo de acción permite a las lipasas actuar en las interfases (**Esquema 1**). Evidentemente, dado que el sustrato natural de las lipasas son las grasas y aceites, esta actividad en la interfase es un requerimiento indispensable para la función biológica de las lipasas³².

El hecho es que las lipasas en medio acuoso presentan actividad catalítica, en muchos casos comparable a la de esterasas no lipásicas, lo que nos sugiere la hipótesis que las lipasas en sistemas acuosos homogéneos se encuentran en un cierto equilibrio entre la conformación cerrada y una/s conformación/s abierta/s que permiten que las lipasas sean catalíticamente activas en ausencia de interfases (**Esquema 2**). La posible existencia de ese equilibrio abre nuevas

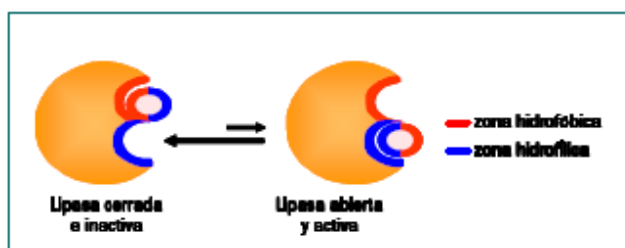
³¹ Sarda, L. ; Desnuelle, P. *Biochim. Biophys. Acta.* **1958**, (30), 513-521

³² Derewenda, U.; Brzozowski, A.M.; Lawson, D. M.; Derewenda, Z.S. *Biochemistry.* **1992**,(31), 1532-1541.

posibilidades en el diseño y control de las biotransformaciones catalizadas por lipasas.



Esquema 1. Activación interfacial de lipasas con interfases hidrofóbicas



Esquema2. Equilibrio conformacional de las lipasas en medios acuosos homogéneos.

1.2.6 Modulación de las propiedades catalíticas de las lipasas

Debido a los grandes cambios conformacionales que sufren las lipasas y el gran número de fuerzas que se implican en el mantenimiento de la estructura de las diferentes conformaciones, el sitio activo de la lipasa puede ser alterado, modificando así las propiedades catalíticas de las lipasas. En la actualidad, la “Ingeniería conformacional” se ha establecido como una herramienta versátil para modificar las propiedades de las lipasas. Ésta se puede abarcar desde dos conceptos: Ingeniería del derivado e Ingeniería del medio.

1.2.6.1 Ingeniería del medio

La complejidad que implica el cambio conformacional que sufren las lipasas, centrándonos en la conformación abierta, la estructura de esta lipasa estará definida por la interacción del bolsillo hidrofóbico, bien con el sustrato o bien con el

medio de reacción, mientras el lid deberá acomodarse mediante un cierto número de interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, etc. Así, cualquier cambio en las condiciones del medio puede alterar entonces significativamente todo el balance de interacciones: los disolventes favoreciendo el bolsillo hidrofóbico y fortaleciendo las interacciones electrostáticas, el pH alterando el tipo y cantidad de interacciones entre el lid y el resto de la superficie de la proteína, la fuerza iónica haciendo más desfavorable la presencia del bolsillo hidrofóbico y debilitando las interacciones del lid con el resto de la proteína, etc. De esta forma, las condiciones experimentales afectan de forma dramática no sólo al equilibrio entre la conformación abierta y cerrada de la lipasa, sino también a la forma exacta del centro activo, y por tanto, a sus propiedades catalíticas³³⁻³⁴.

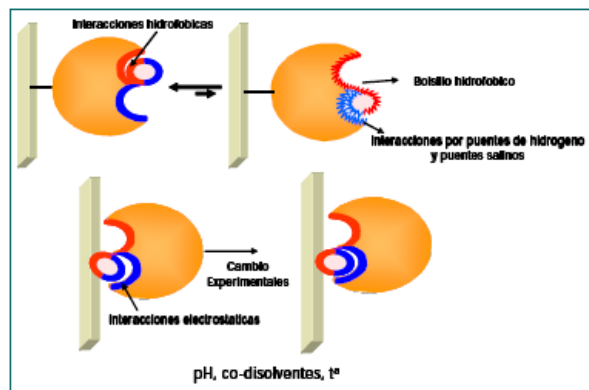
1.2.6.2 Ingeniería del derivado

Las nuevas metodologías que se han desarrollado permiten inmovilizar proteínas de forma controlada y dirigida a través de diferentes zonas de su superficie (aquellas con mayor densidad de cargas positivas o negativas, las zonas más hidrofóbicas, con mayor densidad de histidinas, de lisinas, etc). Además, controlando el grado de activación del soporte y las condiciones de inmovilización, es posible controlar el grado de unión enzima-soporte y por lo tanto la rigidez de la zona inmovilizada. Teniendo en cuenta los grandes cambios conformacionales que implican la apertura y cierre de las lipasas, preparar derivados inmovilizados de lipasas, implicando zonas más o menos alejadas del centro activo, confiriendo más o menos rigidez o alterando el microambiente, podría también alterar en gran medida sus propiedades catalíticas. De esta forma,

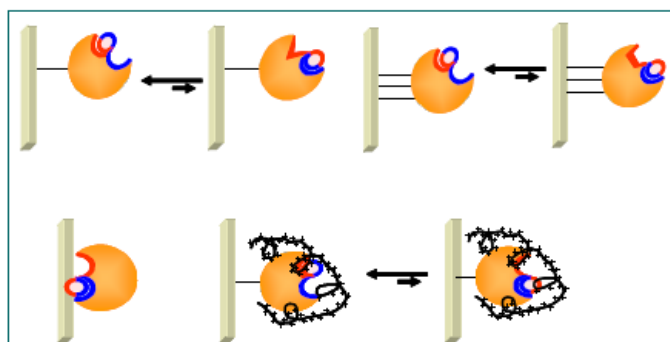
³³ Palomo, J.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; et al. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2002**, 13, 1337-1345.

³⁴ Palomo, J.; Muñoz G.; Fernández-Lorente, G.; et al. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*. **2003**, 21, 201-210.

diferentes derivados de una misma lipasa tendrían propiedades catalíticas (especificidad, selectividad, enantioselectividad, etc) muy diferentes³⁵.



Esquema 3. Efecto de las condiciones experimentales en el mecanismo de apertura y cierre de la lipasa.



Esquema 4. Diferentes metodologías de inmovilización

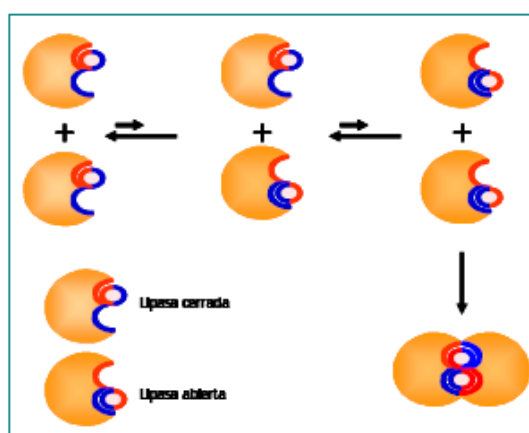
1.2.7 Interacción lipasa-Lipasa

Teniendo en cuenta la gran superficie hidrofóbica que se genera en una lipasa tras la apertura del lid (la molécula de lipasa en su conformación abierta), exponiéndose las áreas hidrofóbicas de alrededor del sitio catalítico además de la parte hidrofóbica del lid, sería posible pensar que toda esta superficie actuase

³⁵ Palomo, J.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C; et al. *Enzyme and Microbial Technology*. **2002**, 31, 775-783.

como una interfase para otra molécula de lipasa próxima a ella en su conformación cerrada, produciéndose la activación interfacial de esta segunda, generándose así una estructura dimérica a través de dos moléculas de lipasa (**Esquema 5**).

De hecho, estructuras diméricas de varias lipasas han sido identificadas mediante estudios de rayos X, mostrándose que estas pueden cristalizar como dímeros en sus conformaciones abiertas³⁶⁻³⁷.



Esquema 5. Mecanismo propuesto para la agregación de lipasas

De hecho, estructuras diméricas de varias lipasas han sido identificadas mediante estudios de rayos X, mostrándose que estas pueden cristalizar como dímeros en sus conformaciones abiertas³⁸. Además, varios autores han presentado en la literatura la existencia de formas agregadas inespecíficas de algunas lipasas (estructuras oligoméricas), aunque esto era debido a las drásticas condiciones experimentales empleadas (p.e muy alta fuerza iónica)³⁹.

³⁶ Nara, S. J.; Harjani, J. R.; Maikrao, M.M; Salunkhe, M. *Tetrahedron Letters*.**2003**, (44), 1371-1373.

³⁷ Ghosh,D.; Wawrzak, Z.; Pletnev, V.Z.; Li,N.; Kaiser, R.; Pangborn, W.*Structure*.**1995**,(3),279-288.

³⁸ Pernas, M.A.; López, C.; Rúa, M.L.; Hermoso, J.*FEBS. Lett.* **2001**,501, 87-91.

³⁹ Rúa, M.L.; Schmidt-Dannert, C.;Wahl, S.; Sprauer, A.; Schmid, R.D. *J. Biotechnol.* **1997**, 56, 89-102.

De este modo es posible pensar que las lipasas pueden presentar una tendencia a auto asociarse dando estructuras con propiedades diferentes que pueden promover ciertos problemas en su caracterización bioquímica, ya que este hipotético dímero puede presentar diferente estabilidad (el hipotético “dímero” podría estar formado por dos estructuras abiertas de lipasas), actividad o enantioselectividad (presentando un centro activo de lipasa accesible, aunque parcialmente bloqueado por la presencia de otro) (**Esquema 5**).

1.2.8 Características físico-químicas de la Lipasa *Candida Antarctica-B*

La lipasa de *Candida antarctica B* (CAL-B) es una enzima con un pequeño bolsillo hidrofóbico entorno al centro activo y aunque se considera carente de lid, Uppenberg y col.⁴⁰ determinaron la existencia de una pequeña cadena polipeptídica en alfa-hélice, la cual puede ser considerada como un potencial lid. Presenta un peso molecular entorno a 33 kDa y un punto isoeléctrico (pI) de 6. Esta enzima ha sido utilizada como catalizador en múltiples aplicaciones en química fina⁴¹.

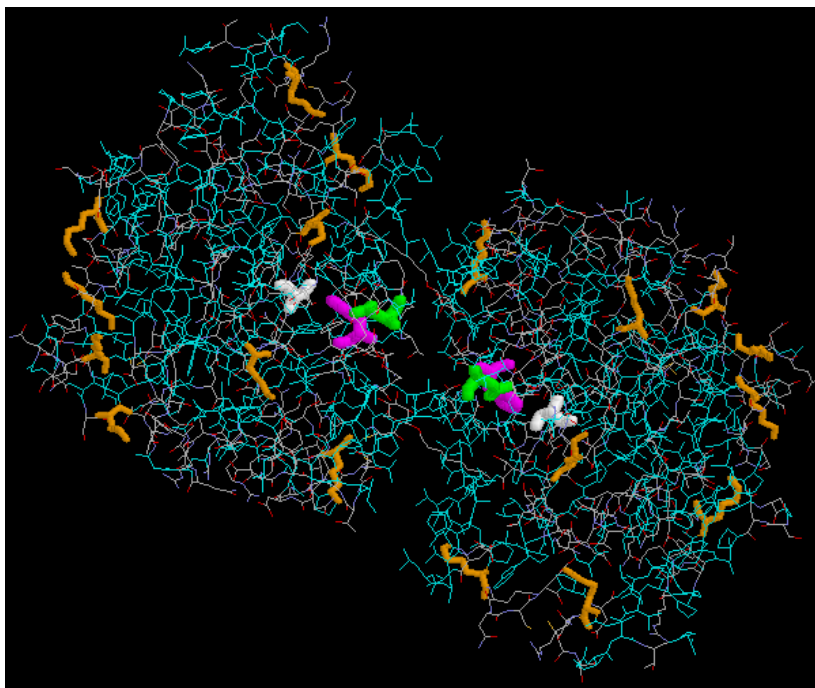
Pese a la baja homología proteica para otras lipasas conocidas y esterases, la **CAL-B** asume la característica de α/β hidrolasa y presenta la típica triada catalítica en el sitio activo Ser-His-Asp. Específicamente **Ser105**, **His224** y **Asp187**. Además posee 2408 átomos pertenecientes a estructuras con propiedades hidrofóbicas.

En el esquema 6 observamos la estructura molecular de la CALB. La triada catalítica (sitio activo) correspondiente a Ser105, His 224 y Asp 187, se aprecian en los colores blanco, uva y verde, respectivamente. La CAL-B presenta una gran

⁴⁰ Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S.; Jones, T. *Biochemistry*. **1994**, 2, 293-308

⁴¹ Anderson, E. M.; Larson, K. M.; Kirk*, O. *Biocatal. Biotransform.* **1998**, 16, 181-204.

zona hidrofóbica (agua marina) y las lisinas (naranja) se ubican en la superficie de la molécula permitiendo la formación de agregados entrecruzados.



Esquema 6. Estructura molecular CAL-B. Tomado de Protein Data Bank, Software de visualización RASMOL.

1.2.9 Resolución cinética catalizada por lipasas

Uno de los métodos usados en la resolución de racematos es la resolución cinética. El éxito del método depende de la reacción de los enantiómeros a diferentes razones con una entidad quiral. La entidad quiral debe estar presente en cantidades catalíticas. La resolución cinética de compuestos racémicos es una de las transformaciones más comunes catalizada por lipasas, ya que la enzima es capaz de discriminar entre los dos enantiómeros de una mezcla racémica, de tal forma que uno de los enantiómeros es fácilmente transformado en su respectivo producto más rápido que el otro⁴².

⁴² Ghanem, Ashraf; Hassan, Y.; Enein, Aboul. *Tetrahedron Asymmetry*. **2004**, 78, 3331-3351

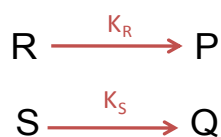


Fig.7 Resolución Cinética Catalítica

La resolución cinética enzimática para un sistema reversible puede visualizarse como sigue: en el estado inicial de la reacción la enzima ataca preferencialmente el enantiómero reactante **A** (reactante más rápido) y lo transforma en su respectivo producto **P**, mientras la concentración del enantiómero **B** (reactante lento) está en su mayor parte sin cambiar. Cuando se establece el equilibrio de dicho enantiómero, la concentración del sustrato lento comienza a cambiar, disminuyendo la pureza óptica del sustrato remanente lento (**B**) y del producto **P**. Por lo que el tiempo óptimo para terminar la resolución es cuando se haya alcanzado el equilibrio del reactante rápido.⁴³

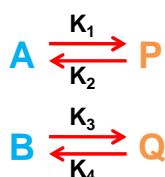


Fig.8 Resolución cinética catalizada por lipasa para un sistema reversible. Para un sistema irreversible $K_2 = K_4 = 0$. La resolución ocurre cuando K_1 es diferente de K_3 , tal que entre mayor sea la diferencia una mejor resolución es obtenida.

1.2.10 Enantioselectividad de las lipasas

Hay dos conceptos muy importantes a tener en cuenta en las reacciones catalizadas por enzimas, el exceso enantiomérico (ee) y la relación enantiomérica E. La pureza óptica o enantiomérica de un compuesto puede ser expresada en términos de su exceso enantiomérico (ee) definido como:

$$\% ee_R = \frac{R - S}{S + R} \times 100 \quad ; \quad R > S \quad (1)$$

⁴³ Referencia 30.

Donde R es la concentración del (R)-enantiómero y S es la concentración del (S)-enantiómero. De tal forma que para un compuesto racémico el valor de ee es cero, y para un compuesto enantioméricamente puro el valor de ee es 1 (o 100%).

Las lipasas poseen la habilidad de discriminar entre dos enantiómeros de una mezcla racémica, el parámetro escogido para describir la estereoselectividad o enantioselectividad de las reacciones catalizadas por lipasa es la enantioselectividad, también llamada relación enantiomérica **E**. Éste es un parámetro cinético, el cual depende del catalizador además de ser sensible a los cambios del medio (pH, T, etc.). El valor de E está definido como la relación de las constantes específicas de velocidad para los dos enantiómeros de la mezcla racémica:

$$E = \frac{k_1}{k_3} = \frac{(k_{cat}/K_M)_R}{(k_{cat}/K_M)_S} ; \quad \text{R es el enantiómero reactante más rápido} \quad (2)$$

Donde k_{cat} es la constante de velocidad y K_M es la constante de Michaelis-Menten. Sih et al⁴⁴, desarrollaron esta ecuación en términos del exceso enantiomérico del producto (ee_p), el enantiómero remanente (ee_s) y la conversión (c). Tal que para una reacción enzimática reversible, el valor de E puede ser expresado por la siguiente ecuación:

$$E = \frac{\text{Ln}[1 - (1 + K)c(1 + ee_p)]}{\text{Ln}[1 - (1 + K)c(1 - ee_p)]} = \frac{\text{Ln}[1 - (1 + K)(c + ee_s\{1 - c\})]}{\text{Ln}[1 - (1 + K)(c - ee_s\{1 - c\})]} \quad (3)$$

Donde K es la constante de equilibrio. K es una función termodinámica que es independiente de las propiedades de la enzima, sólo depende del estado inicial

⁴⁴ Referencia 30.

y final por lo que no depende del camino de reacción. Además la pureza óptica de los compuestos (producto y sustrato remanente) varía de manera inversa con la constante de equilibrio aún para sistemas con alta enantioselectividad ($E > 1000$).

Cuando la reacción es irreversible o la reacción reversa es insignificante ($K = 0$), la ecuación 3 puede ser reducida a:

$$E = \frac{\ln[1 - c(1 + ee_p)]}{\ln[1 - c(1 - ee_p)]} = \frac{\ln[(1 - c)(1 - ee_s)]}{\ln[(1 - c)(1 + ee_s)]} \quad (4)$$

Donde c está expresada por la siguiente ecuación:

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p}$$

Para calcular el valor de E , uno puede medir dos de las tres variables: ee_s , ee_p y c . Una reacción no selectiva tiene un valor de E de 1, mientras un valor de E por encima de 20 es el mínimo para una resolución plausible.

1.2.11 Mandelato de metilo y producción del ácido 2-hidroxi-fenilacético (ácido mandélico).

La reacción de hidrólisis del Mandelato de metilo puede llevarse a cabo a través de la catálisis enzimática de la Lipasa CAL-B, como se observa en la **Figura 9**.

Los isómeros puros del ácido mandélico (3) y sus correspondientes ésteres son muy utilizados en síntesis orgánica. Los enantiómeros del ácido mandélico presentan gran interés ya que son precursores en la síntesis de varios fármacos.

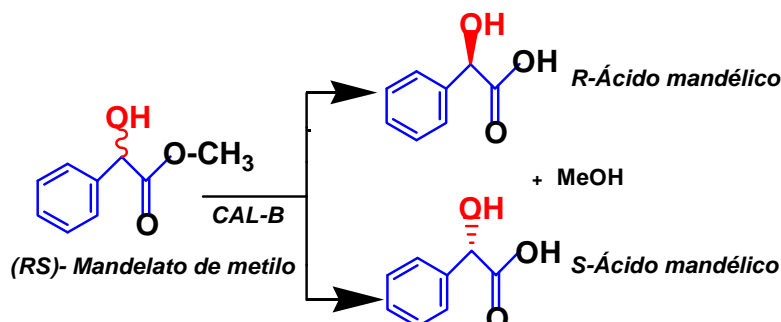
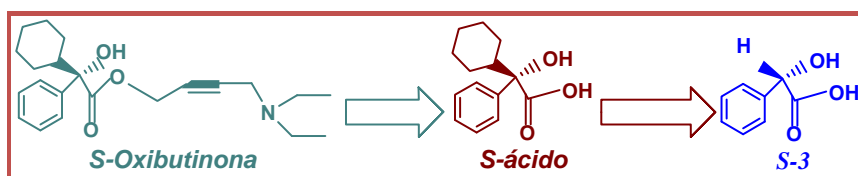


Fig. 9 Reacción de hidrólisis del Mandelato de metilo.

La Oxibutinina (Esquema 8), receptor antagonista muscarínico, es un fármaco de gran interés en la industria farmacéutica, el cual está indicado para el tratamiento de la incontinencia urinaria. Sin embargo, efectos secundarios no deseados (sequedad de mucosas, visión borrosa, náuseas, desvelo y palpitaciones cardiovasculares) limitan su utilidad clínica.

Durante el desarrollo de la síntesis asimétrica del (S)-ácido (Esquema 8), precursor quiral del S-oxibutinina, químicos de Sepracor desarrollaron un nuevo y práctico proceso empezando por el ácido S-mandélico (S-3) y la ciclohexanona⁴⁵. Debido a que el isómero S presenta toda la actividad farmacológica, debía buscarse una estrategia de síntesis para la obtención del fármaco enantioméricamente puro. Para la economía del proceso sintético, es necesario optimizar la etapa anterior donde se lleva a cabo la resolución enantioselectiva del ácido mandélico de forma enzimática⁴⁶.

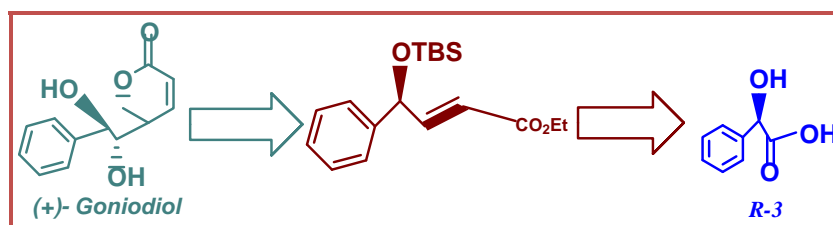


Esquema 7. Ruta retrosintética de S-oxibutinina.

⁴⁵ Grover, P. T.; Bhongle, N. N.; et al. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 6283-6287

⁴⁶ Kazuhiko, T.; Kazuo, O.; et al. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, 40, 1415-1423

Otro ejemplo es el (+)-Goniodiol, [(1'R,2'S,5R)-5-(1',2'-dihidroxi-2-feniletill)-pent-2-eno-5- lactona]] (Esquema 9), una estiril-lactona que exhibe una potente y selectiva citotoxicidad frente al carcinoma de pulmón humano⁴⁷. Debido a sus características estructurales y a su potente actividad biológica, varios grupos se plantearon la síntesis de esta estiril-lactona a partir del isómero R del ácido mandélico⁴⁸; empleando el 2,3-O-isopropiliden-Dgliceraldehído⁴⁹ como bloque estructural, o basándose en reacciones asimétricas de formación estereoselectiva de enlace carbono-carbono con complejos de cromo tricarbonil (η^6 -areno)⁵⁰ o bien mediante reacciones de dihidroxilación y epoxidación asimétrica de Sharpless⁵¹.



Esquema 8. Ruta retrosintética de (+)-Goniodiol.

1.2.12 Métodos para la determinación del exceso enantiomérico.

Entre los métodos existentes para la determinación del exceso enantiomérico (ee), la enantioselectividad (E) y conversión (c), se encuentran la cromatografía gaseosa (**GC**), la cromatografía líquida de alta eficiencia (**HPLC**), métodos polarimétricos y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (**RMN**).

La cromatografía gaseosa es un método rápido, fácil de realizar, no es afectado por la presencia de impurezas en la muestra analizada, por lo tanto, no

⁴⁷ Fang, X. P.; Anderson, S. E.; et al. *J. Nat. Prod.* **1991**, 54, 1034-1043.

⁴⁸ (a) Tsubuki, M.; Kanai, K.; Honda, T. *J. Chem. Soc.* **1992**, 1640-1641. (b) Yang, Z. C.; Zhou, W. *S. Heterocycles.* **1997**, 45, 367-383.

⁴⁹ Mukai, C.; Hirai, S.; Hanaoka, M. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6619-6626.

⁵⁰ Tsubuki, M.; Kanai, K.; Honda, T. *Synlett.* **1993**, 653-655.

⁵¹ Xu, D.; Sharpless, K. B. *Tetrahedron lett.* **1994**, 35, 4685-4688.

es necesario que la muestra sea aislada y purificada. Además, no se requiere gran cantidad de muestra, por lo que las reacciones pueden ser llevadas a cabo a pequeña escala. Este método se basa en el hecho que la asociación molecular puede llevar a un reconocimiento quiral eficiente, logrando una separación enantiomérica cuando una fase quiral estacionaria (ciclodextrinas) es usada en GC. EL gas (fase móvil: hidrógeno, helio, nitrógeno) transporta el analito quiral a través de la fase estacionaria. Los enantiómeros a ser analizados experimentan interacciones diastereoméricas rápidas y reversibles con la fase quiral estacionaria, de donde pueden ser eluidos en diferentes tiempos. Una de las limitaciones asociadas con este método es que la muestra debe ser lo suficientemente volátil, térmicamente estable y soluble en la fase quiral estacionaria usada. La medida del exceso enantiomérico con GC contiene un alto grado de precisión, por lo que pueden ser obtenidos datos confiables. Es decir, que pueden ser detectados excesos enantioméricos altos (>99%). La cromatografía líquida se basa en los mismos principios y tiene las misma ventajas que la cromatografía gaseosa, la mayor diferencia es que compuestos más polares y no volátiles pueden ser analizados⁵².

⁵² Referencia 43

2. METODOLOGÍA

2.1 MATERIALES

La lipasa de *Candida antarctica B* (Novozym 525 L) (CAL-B) se obtuvo de Sigma Chemical, los marcadores de peso molecular son de Fermentax. El *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NPB), (R,S)-Mandelato de metilo, (R)-Mandelato de metilo y (S)-Mandelato de metilo se obtuvieron de Sigma. Las soluciones de los extractos comerciales de las lipasas fueron preparadas en una solución de fosfato de potasio 5mM y pH 7.

2.2 ANÁLISIS DE PROTEINAS

2.2.1 Determinación de la concentración de proteína.

La determinación de proteínas se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford⁵³. Este método se utiliza por ser rápido, reproducible y sensible para cuantificar proteínas, sin interferencias por la presencia de aminoácidos y carbohidratos.

La concentración de proteínas se obtuvo por interpolación con una curva de calibración (anexo A) que correlacionó la concentración de proteína con la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de haz simple Spectroquant® Nova 400, utilizando como patrón seroalbúmina bovina (BSA) para determinar las

⁵³ Bradford, M. *Anal. Biochem.* **1976**. (72), 248-254.

concentraciones de proteína en un rango comprendido entre 0,1 y 1 mg/mL (BSA). La concentración de proteínas se expresó en mg de proteína por ml (mg/mL) de solución.

2.2.2 Determinación de la actividad enzimática de CAL-B

El ensayo se llevó a cabo midiendo el aumento en el valor de absorbancia a 348 nm producido por la formación de *p*-nitrofenol en la hidrólisis de 0,4mM de *p*-NPB disuelto en buffer fosfato de potasio 25 mM, a pH 7 y 25 °C. Para iniciar la reacción, 0,02 mL de solución lipásica o suspensión se adicionó a 2,5 mL del sustrato (*p*-NPB). Una unidad internacional de actividad de *p*-NPB se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol de *p*-NPB por minuto (IU) bajo las condiciones descritas anteriormente. El coeficiente de extinción molar utilizado para el producto de reacción fue de $3100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.3 ELABORACIÓN DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS DE CAL-B.

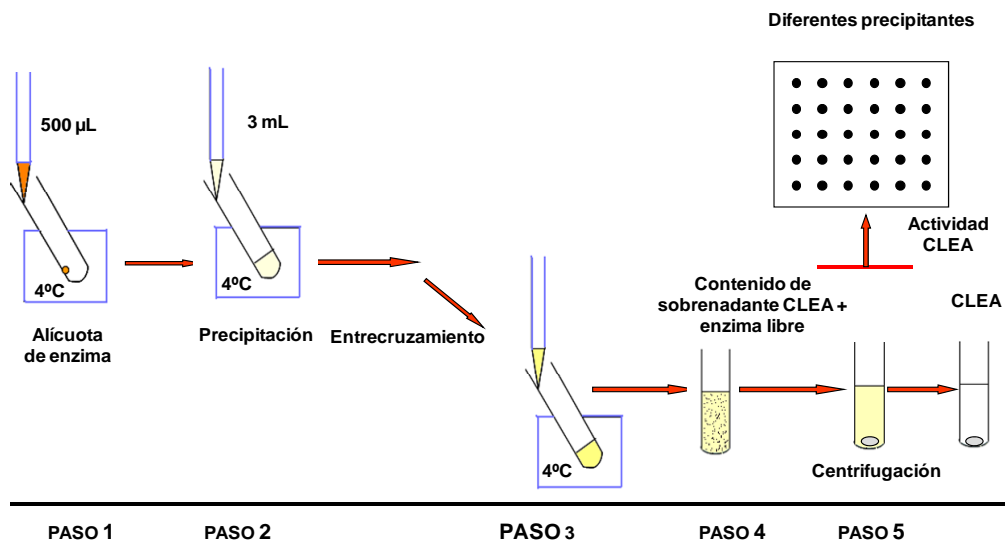
2.3.1 Procedimiento para la elaboración de los agregados entrecruzados

Paso 1

Se transfirió un volumen de 0.5 ml de la enzima CAL-B a un tubo de ensayo de fondo plano.

Paso 2. Etapa de precipitación

Al tubo de ensayo conteniendo CAL-B se adicionó 3.0 ml de agente precipitante seleccionado (dimetil éter, alcohol *terc*-butílico y sulfato de amonio), (50, 70, 90 % v/v).



Esquema 9. Procedimiento para la elaboración de CLEAs.

Paso 3. Entrecruzamiento del agregado formado

Al agregado de CAL-B formado se le adicionó glutaraldehído como agente entrecruzante a concentraciones de 0,5, 1 y 2 %V/V, el cual reacciona con los grupos amino presentes en la superficie de la enzima, permitiendo su posterior insolubilización.

Paso 4. Medición de la actividad catalítica del agregado entrecruzado conteniendo enzima libre.

De la mezcla acuosa conteniendo agregados entrecruzados de CAL-B y enzima libre que no reaccionó con el glutaraldehído, se extrajo un volumen de 50 µL y se diluyó en una relación de (1:20) con un buffer de fosfato 25 mM de pH 7, determinando su actividad catalítica tal como fue descrito en la sección 2.2.2.

Paso 5. Determinación de proteínas y medición de la actividad catalítica del sobrenadante

Se centrifugó la mezcla acuosa conteniendo los agregados entrecruzados insolubles y la enzima libre. Se determinó la concentración de proteínas presentes tal como lo describe el método colorimétrico de Bradford⁵⁴ para evaluar el nivel de entrecruzamiento. Así mismo, se determinó la actividad catalítica como se describe en la sección 2.2.2.

La actividad catalítica de los agregados entrecruzados de CAL-B se determinó como la diferencia entre la actividad catalítica del paso 4 y la actividad del paso 5.en (U/mg)

2.3.2 Optimización del Agente Precipitante.

Para la optimización del agente precipitante se seleccionó como posibles agentes el alcohol *terc*-butílico, el sulfato de amonio y el dimetil éter (DME). Para la elaboración de agregados entrecruzados se preparó un extracto soluble de proteína que tuviera la misma concentración en cada uno de los ensayos respectivos (1 mg/mL), de la misma forma se mantiene constante el pH y la temperatura de reacción, 7 y 4 °C respectivamente; y el glutaraldehído como agente entrecruzante 1% (p/v). Para la optimización cuantitativa de estas variables se llevó a cabo un diseño experimental factorial multinivel, el cual consiste de 9 ejecuciones para cada agente precipitante. Las variables estudiadas se presentan en la **tabla 1**.

El orden de los experimentos es aleatorio, lo cual permite despreciar el efecto de variables ocultas.

Tabla 1. Condiciones experimentales en la selección de variables significativas para la optimización de agente precipitante.

VARIABLE CUALITATIVA	LOG P (-1)	LOG P (0)	LOG P (+1)
<i>Agente precipitante</i>	sulfato de amonio	<i>t</i> -butanol	DME

FACTOR	NIVEL BAJO (-1)	NIVEL MEDIO (0)	NIVEL ALTO (+1)
<i>Concentración precipitante (% v/v)</i>	50	70	90
<i>Tiempo de reacción (min)</i>	15	30	60

2.3.3 Optimización de la elaboración de agregados entrecruzados.

Para la elaboración de agregados entrecruzados se mantuvo constante el pH y la temperatura de reacción, 7 y 4 °C, respectivamente. Para la optimización cuantitativa de estas variables se llevó a cabo un diseño experimental factorial multinivel, el cual consistió de 27 ejecuciones para el agente precipitante óptimo. El orden de los experimentos fue aleatorio, lo cual permitió desprestigiar el efecto de variables ocultas. Las variables estudiadas se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones experimentales en la selección de variables significativas para la optimización de CLEAs.

FACTOR	NIVEL BAJO (-1)	NIVEL MEDIO (0)	NIVEL ALTO (+1)
<i>Concentración de proteína (mg/mL)</i>	3	5	7
<i>Concentración precipitante (% v/v)</i>	50	70	90
<i>Concentración entrecruzante (% p/v)</i>	0,5	1	1,5

2.4 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS PAGE-SDS PAGE

El derivado enzimático obtenido fue confirmado por electroforesis SDS-PAGE. Las muestras fueron tratadas durante 5-10 minutos a 100°C en presencia

de tampón de ruptura (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 – SDS 2% -β-mercaptoetanol 5% - glicerol 10% y azul de bromofenol al 0,005%). La electroforesis se realizó a temperatura ambiente y 150 mV de corriente constante utilizando como electrolito Tris-HCl 25 mM-glicina 192 mM y SDS 1%. La visualización de las proteínas se realizó mediante tinción con azul brillante de Coomassie R-25072. Se utilizaron marcadores de bajo peso molecular: fosforilasa b (94 KD), BSA (66,2 KD), ovoalbúmina (45 KD), anhidrasa carbónica (30 KD) e inhibidor de tripsina (20,1 KD).

2.5 EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS ELABORADOS BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS

Los agregados entrecruzados de CAL-B (200 µL de suspensión) que fueron elaborados bajo las condiciones óptimas, se incubaron a diferentes temperaturas (70°C, 80°C y 90°C) en 1 ml de solución buffer de fosfato 25 mM de pH 7. Periódicamente (0, 5, 15, 30, 60 min), fueron retiradas muestras del medio de incubación a las cuales se les determinó su actividad enzimática como se describe en la sección 2.2.2.

2.5 EFECTO DEL pH EN LA HIDRÓLISIS ENANTIOSELECTIVA DE MANDELATO DE METILO.

El mandelato de metilo [(±),(-),(+)-1] fue preparado a una concentración 1mM en una solución buffer fosfato de potasio 25 mM a distintas condiciones de pH (5, 6, 7 y 8) y 25°C. Para llevar a cabo la reacción se añadieron 10 mg de CLEA de CAL-B. Periódicamente se extrajo una alícuota de 500 µL que fue cuantificada por HPLC.

2.6 EFECTO DE SOLVENTES ORGÁNICOS EN LA HIDRÓLISIS ENANTIOSELECTIVA DE MANDELATO DE METILO.

El mandelato de metilo [(±),(-),(+)-1] fue preparado a una concentración 1mM en una solución buffer fosfato de potasio 25 mM pH 7 y en presencia de solvente orgánico al 10% V/V (propanol, isopropanol, *terc*-butanol y butanol) a 25°C. Para llevar a cabo la reacción se añadieron 10 mg de CLEA de CAL-B. Periódicamente se extrajo una alícuota de 500 µL para ser cuantificada por HPLC.

2.7 ANÁLISIS POR HPLC

El grado de hidrólisis se analizó por HPLC en fase reversa, utilizando como columna una Zorbax XDB-C18 (4,6 mm x 250 mm) suministrada por Agilent Technologies. Cada ensayo se realizó por triplicado. La fase móvil fue una mezcla isocrática de acetonitrilo y buffer fosfato de amonio 10 mM y pH=3.0 en proporción 35:65 v/v. El flujo utilizado fue 1 mL/min y la detección UV fue desarrollada a 225 nm. Los tiempos de retención fueron los siguientes: ácido mandélico (3.369 min) y mandelato de metilo (5.637 min).

Para la cuantificación del grado de hidrólisis del mandelato de metilo se realizó previamente una curva de calibración para determinar concentraciones en un rango comprendido entre 0,1 mM y 1.2 mM. La actividad específica (AE) se define como µmol de sustrato hidrolizado por minuto y por miligramo de CLEA de lipasa CAL-B, y fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$AE = \frac{[\text{S}]_0 - [\text{S}]_t}{mt}$$

Donde:

[S] = concentración del sustrato

m = mg de CLEA

c = conversión (tanto por uno)

t = tiempo de reacción (min)

V = volumen de reacción

2.7.1 Determinación del exceso enantiomérico y la enantioselectividad.

A diferentes grados de conversión (entre 10-20% conversión) se analizó el exceso enantiomérico (ee) del ácido formado a través de HPLC en fase reversa.

La enantioselectividad fue calculada como la relación de la velocidad inicial de hidrólisis de ambos isómeros puros (hidrólisis alrededor del 10-30% del éster). Para determinar las variables anteriores, la resolución cinética del mandelato de metilo fue estudiada llevando a cabo la hidrólisis con cada uno de los enantiómeros puros (R y S) bajo las mismas condiciones de reacción y al mismo tiempo, monitoreando periódicamente la concentración del sustrato y del producto formado durante la reacción (ácido mandélico) al mismo tiempo en ambas reacciones.

3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

3.1 ELABORACIÓN DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS DE CAL-B

3.1.1 Optimización del Agente Precipitante.

Los resultados obtenidos para la optimización del agente precipitante se exponen en la **tabla 3**. Donde la actividad relativa es la actividad del CLEA obtenido en relación a la actividad de la enzima soluble bajo las mismas condiciones experimentales.

Tabla 3. Matriz de resultados de la elaboración de los agregados entrecruzados en la optimización del Agente precipitante.

<i>Experiencia Nº</i>	<i>Agente precipitante</i>	<i>[Agente precipitante] (% v/v)</i>	<i>Tiempo reacción (min)</i>	<i>Actividad relativa (%)</i>
1	-1	-1	1	70,05
2	0	-1	0	50,25
3	1	0	0	40,1
4	-1	-1	0	0
5	0	1	0	250,76
6	0	1	1	301,01
7	1	1	-1	10,15
8	1	-1	0	40,1
9	1	1	0	29,44
10	-1	1	-1	19,8
11	-1	-1	-1	50,25
12	0	-1	1	390,86
13	-1	0	1	129,95
14	1	0	1	140,1
15	-1	0	-1	20,3
16	0	0	-1	89,85
17	1	-1	-1	40,1
18	-1	1	1	160,4
19	0	0	1	19,8
20	1	-1	1	0
21	0	0	0	80,2
22	0	1	-1	30,46
23	-1	1	0	20,3
24	1	1	1	0
25	1	0	-1	20,3
26	0	-1	-1	200
27	-1	0	0	0

En la **tabla 3** se observa que los valores de actividad relativa obtenidos para los agregados entrecruzados de Lipasa *Candida Antarctica B* formados bajo las condiciones estudiadas, son en algunos casos valores mayores al 100%, es decir presenta una actividad mayor que la de la enzima soluble, la cual presenta una actividad específica de **27.8 U/mg**.

En la experiencia No. 12 se obtuvo el mayor incremento de la actividad enzimática, con un factor de 3,91 veces respecto a la actividad de la enzima soluble, esto corresponde a la matriz experimental (0,-1,1) que pertenece a las condiciones experimentales de *t*-butanol al 50% en un tiempo de precipitación de 60 minutos.

En la **figura 10** se muestra el gráfico de Pareto obtenido para el diseño experimental utilizado. En este gráfico se palpan cada uno de los efectos estimados de las variables y sus interacciones, en orden decreciente de magnitud sobre la actividad de los agregados entrecruzados de CAL-B. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado, que es el efecto estimado dividido por su error estándar. Esto equivale a calcular un estadístico-t para cada efecto. La línea vertical que aparece en el gráfico permite determinar cuáles efectos son estadísticamente significativos en un 95% de nivel de confianza. De esta forma se realizó una selección de las variables que tienen una mayor incidencia en la elaboración de los agregados entrecruzados de la enzima, permitiendo escoger el mejor agente precipitante de los 3 estudiados.

A partir del diagrama de Pareto se estableció que el tiempo de precipitación y la concentración de agente precipitante no influye de forma significativa sobre la actividad de los agregados entrecruzados de CAL-B, por tal razón no se tuvieron en cuenta para el análisis estadístico.

Gráfico de Pareto estandarizado para actividad

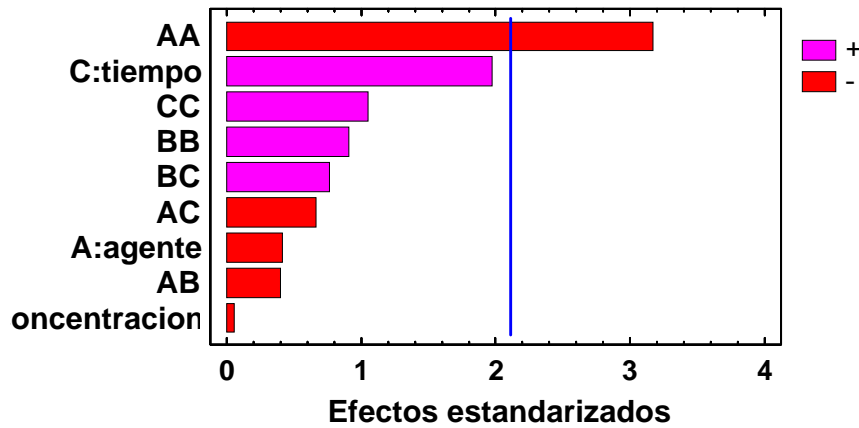


Figura 10. Diagrama de Pareto para las variables del proceso de elaboración de los agregados entrecruzados para la optimización del agente precipitante.

Para comprobar la importancia estadística de las variables, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa STATGRAPHICS plus 5.1, en el cual se observó que el agente precipitante influye de manera significativa sobre la actividad relativa de los agregados entrecruzados de CAL-B. Las interacciones presentes en la tabla ANOVA (AA) son propias de las interacciones de las variables del agente precipitante las cuales tienen un 95% de significancia sobre la actividad relativa de los agregados. La **tabla 4** resume el análisis de ANOVA.

Tabla 4. Datos de ANOVA para la optimización del agente precipitante

VARIABLE	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	P-VALOR
AA	7,67E+04	1	0,0035
Error total	1,85E+05	25	
Total (corr.)	2,62E+05	26	

Es importante señalar que en la **tabla 4** los valores de P mostrados son significativos al nivel 0.05, con lo cual hay evidencia que el agente precipitante AA

tiene un gran efecto sobre la actividad relativa, y determina el grado de significancia de cada uno de los efectos de las variables sobre la actividad relativa de los agregados entrecruzados de la CAL-B.

Como se había mencionado anteriormente las Lipasas poseen un equilibrio que modula sus propiedades catalíticas y que depende de factores como el pH, la temperatura y la fuerza iónica. Con el agente precipitante de *t*-butanol se observaron las mayores actividades relativas y por tanto se obtuvo el CLEA óptimo, esto puede atribuirse a que sus interacciones hidrofóbicas con la enzima CAL-B favorecen la conformación abierta. Sin embargo, los CLEAs obtenidos con DME poseen actividades catalíticas menores que la de la enzima nativa e incluso en algunos casos con actividad nula, a pesar de ser éste más hidrofóbico que el *t*-butanol, esto pudo haber ocurrido debido a que su alta hidrofobicidad puede llevar a una desnaturalización de la enzima.

Las interacciones enzima-Sulfato de amonio también registraron algunas pérdidas de actividad obteniendo enzimas inmovilizadas en ocasiones con actividad nula, lo cual puede ser atribuido a la gran fuerza iónica comprometida, distorsionando la estructura nativa de la enzima y las interacciones que contribuyen al mantenimiento de la conformación de la estructura proteica. En este caso, la mayor actividad relativa fue 160.40% con una concentración de sulfato de amonio del 90% v/v y un tiempo de reacción de 60 minutos.

Por todo lo anterior, *t*-butanol fue seleccionado como agente precipitante óptimo, y por tanto para realizar los posteriores ensayos experimentales.

3.1.2 Optimización de la fuerza iónica.

Con el fin de proseguir con la optimización de los agregados entrecruzados se utilizaron los resultados obtenidos a partir de la optimización del agente precipitante. Así, se usó *t*-butanol como agente precipitante y un tiempo de

precipitación de una hora, variando la fuerza iónica del medio acuoso en que se encuentra el preparado enzimático y éste en presencia o no de albumina. Los resultados obtenidos se observan en las **tablas 5 y 6**.

Tabla 5. Resultado de las actividades obtenidas de los CLEAS de CAL-B en ausencia de albumina a diferente fuerza iónica respecto a la actividad específica de la enzima soluble. Los CLEAs fueron elaborados a 4 °C y pH=7.0

SIN ALBUMINA			
CONCENTRACIÓN	5 mM	50 mM	100 mM
	% ACTIVIDAD DEL CLEA	% ACTIVIDAD DEL CLEA	% ACTIVIDAD DEL CLEA
3 mg/ml 50% V/V 1% Glut.	50,00%	86,70%	175,50%
3 mg/ml 70% V/V 1% Glut.	29,40%	50,00%	138,90%
3 mg/ml 90% V/V 1% Glut.	57,40%	96,20%	105,80%

Tabla 6. Resultado de las actividades obtenidas de los CLEAS de CAL-B en presencia de albumina a diferente fuerza iónica respecto a la actividad específica de la enzima soluble. Los CLEAs fueron elaborados a 4 °C y pH=7.0

CON ALBUMINA			
CONCENTRACIÓN	5 mM	50 mM	100 mM
	% ACTIVIDAD DEL CLEA	% ACTIVIDAD DEL CLEA	% ACTIVIDAD DEL CLEA
1 mg/ml 50% V/V 1% Glut.	76,30%	96,30%	115,20%
1 mg/ml 70% V/V 1% Glut.	68,90%	95,63%	179,60%
1 mg/ml 90% V/V 1% Glut.	86,32%	105,23%	146,30%

Según los resultados obtenidos un aumento de la fuerza iónica favorece la hiperactivación enzimática. Puesto que la fuerza iónica desfavorece el bolsillo hidrofóbico de las moléculas de lipasa al debilitar las interacciones del “lid” con la superficie de proteína, lo anterior sólo puede atribuirse a que una fuerza iónica mayor favorece la etapa de precipitación durante el proceso de obtención de los CLEAs.

En el caso del CLEA obtenido en ausencia de albúmina el mejor resultado fue utilizando una concentración de t-butanol (agente precipitante) del 50%, con una hiperactivación enzimática alrededor de 1,8 veces. Mientras para el caso de obtención del CLEA en presencia de albumina, el mejor resultado fue utilizando una concentración de t-butanol del 70%, con una hiperactivación enzimática alrededor de 1,8 veces.

3.1.3 CLEAs con presencia de seroalbumina de bovino.

Tabla 7. Matriz de resultados para los agregados entrecruzados de CAL-B en presencia de albumina.

<i>Experiencia Nº</i>	<i>[Proteína] (mg/mL)</i>	<i>[Ag, precipitante] (%v/v)</i>	<i>[Ag, entrecruzante] (% p/v)</i>	<i>Actividad relativa (%)</i>
1	-1	0	0	179,6
2	-1	1	1	296,34
3	-1	0	-1	111,16
4	0	0	1	28,51
5	-1	-1	0	7,4
6	-1	1	-1	18,57
7	1	0	0	140,02
8	-1	0	1	185,27
9	1	1	0	30,02
10	0	1	-1	114,3
11	0	-1	1	21,45
12	-1	1	0	146,3
13	-1	-1	-1	203,66
14	1	0	-1	30
15	1	-1	1	80,02
16	1	-1	0	30,02
17	1	1	-1	345,5
18	0	0	0	14,3
19	1	0	1	23,52
20	0	-1	-1	7,13
21	0	1	0	42,83
22	0	-1	0	100
23	1	1	1	150
24	1	-1	-1	55,01
25	-1	-1	1	296,25
26	0	1	1	35,71
27	0	0	-1	21,45

La **tabla 7** ilustra los resultados de la actividad enzimática obtenidos para los agregados entrecruzados de CAL-B en presencia de albúmina. En general, se

obtuvieron resultados muy favorables en su mayoría con actividades superiores a la actividad de la enzima soluble; esta última fue tomada como 100%. **(27.8 U/mg)**

La presencia de la proteína seroalbumina de bovino en el medio de reacción favorece la precipitación de la lipasa CAL-B, aunque esto puede generar también restricciones para el acceso de los sustratos al sitio activo de la lipasa. El CLEA que presentó mayor retención de la actividad respecto a la enzima soluble (tabla 7) con un factor de casi 3.5 veces fue el de la matriz (1,1,-1) que se dió con el factor experimental de 7 mg/mL al 90% (v/v) con una concentración de agente entrecruzante de 0.5%, valores muy cercanos al encontrado en el caso de las matrices (-1,-1,1), (-1, 1, 1) Estas matrices corresponden a 3 mg/mL de CAL-B, agente entrecruzante al 1.5%, y concentración de agente precipitante al 90 y 50%, respectivamente.

En la **tabla 7** también se presentan porcentajes de actividad relativa muy bajos, por ejemplo una actividad de 0.074 veces la actividad de la enzima soluble, que se presentó cuando se trabajó con 3 mg/mL de proteína, con concentración de *t*-butanol al 50% y glutaraldehído al 1%.

En términos generales, se determinó que para una baja concentración de glutaraldehído (1.0% p/v) los rendimientos de inmovilización de proteína son muy bajos, lo que se atribuye a que el número de los grupos reactivos funcionales del glutaraldehído bajo esta concentración son reducidos, lo cual disminuye la posibilidad de entrecruzamiento con los residuos de lisina presentes en la CAL-B⁵⁴. Así, el aumento de la concentración del glutaraldehído hasta un 1.5% (p/v) permitió alcanzar mejores rendimientos de inmovilización de proteína,

⁵⁴ Brown, G.B. "Chemically aggregated enzymes", Methods in enzymology, academic press. (1976) 263-280.

A partir de los resultados mostrados en la **tabla 7** se determinó a través de un gráfico de Pareto, que las concentraciones de proteína y glutaraldehído, ejercen una influencia significativa sobre la actividad enzimática de los agregados entrecruzados de la lipasa. La **figura 11** muestra el gráfico de Pareto para el análisis de las variables del proceso de entrecruzamiento utilizando el *t*-butanol como precipitante.

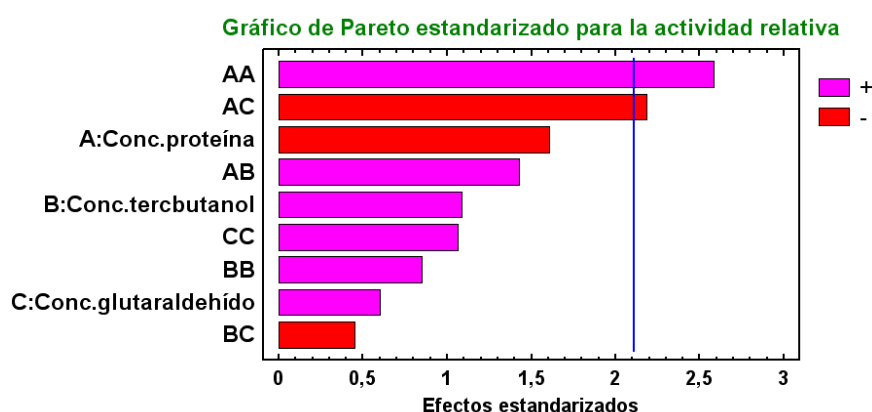


Figura 11. Diagrama de Pareto en la optimización de los agregados entrecruzados de CAL-B en presencia de albumina.

El análisis de varianza (ANOVA) expuesto en la **tabla 8**, muestra el grado de significancia de cada uno de los efectos de las variables sobre la actividad específica de los agregados entrecruzados de CAL-B. El valor estadístico Para cada uno de los efectos indica niveles de confiabilidad del 95%.

Tabla 8. Datos de ANOVA para la optimización del CLEA en presencia de albumina

VARIABLE	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	P-VALOR
AA	4,49E+04	1	0,0189
AC	3,22E+04	1	0,0436
<i>Error total</i>	1,70E+05	24	
<i>Total (corr.)</i>	2,47E+05	26	

Las **figuras 12 y 13** muestran los gráficos de superficie de respuesta y contorno para los resultados expuestos en la **tabla 7**.

A partir del análisis estadístico se realizó la estimación de las condiciones de operación óptimas para la elaboración del agregado entrecruzado en presencia de albumina, observándose que se obtiene un valor máximo de actividad relativa cuando se tiene una matriz de (-1,1,1) que corresponde a una concentración de enzima de 3 mg/mL con una concentración de *t*-butanol del 50% (v/v) y 1.5% (p/v) de agente entrecruzante.

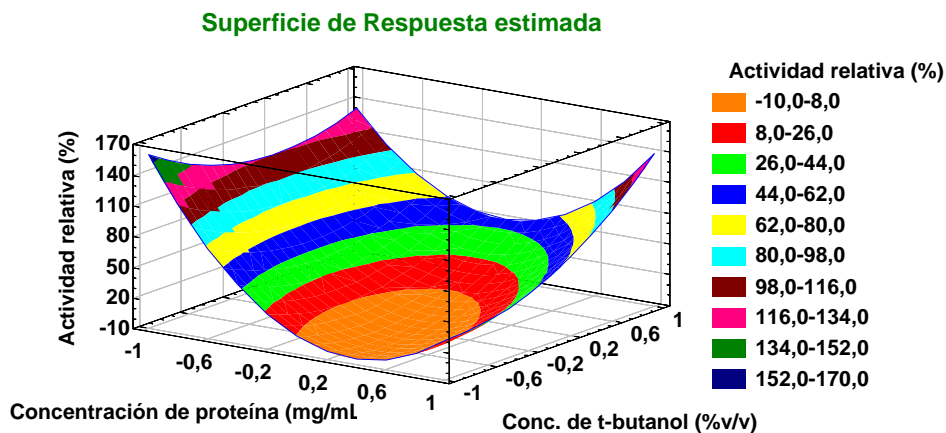


Figura 12. Superficie de respuesta en la optimización de los agregados entrecruzados de CAL-B en presencia de albumina.

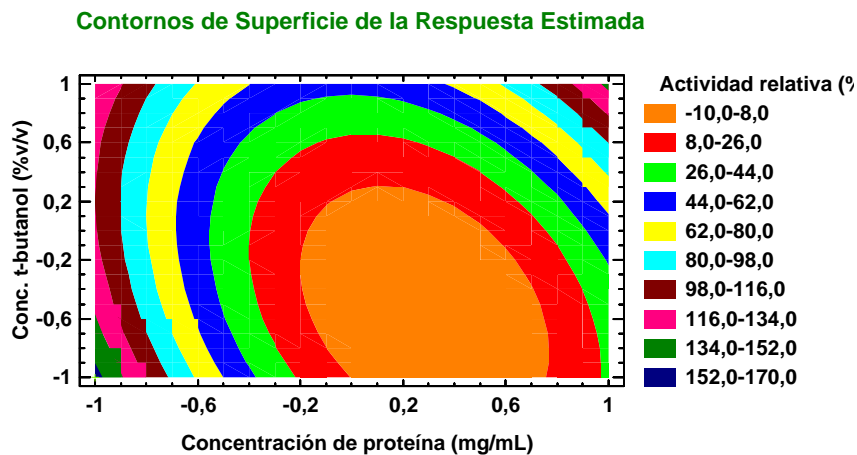


Figura 13. Contorno de superficie de respuesta en la optimización de los agregados entrecruzados de la CAL-B en presencia de albumina.

Según datos experimentales y estadísticos la concentración de proteína que favoreció el entrecruzamiento fue la menor (3 mg/mL). Esto pudo haber ocurrido debido a que en altas concentraciones las lipasas presentan una tendencia a auto asociarse en forma de dímeros, estructuras con propiedades diferentes que pueden promover ciertos problemas en su caracterización bioquímica, ya que este dímero presenta un centro activo de lipasa accesible, aunque parcialmente bloqueado por la presencia de otro.

3.1.4 CLEAs en ausencia de seroalbumina de bovino.

En la **tabla 9** se muestran las actividades relativas de la enzima inmovilizada para cada una de las matrices del diseño experimental, destacándose la matriz de (-1,-1,-1) mediante la cual se obtuvo un CLEA con una actividad enzimática 10 veces más alta que la enzima soluble, que presentó una actividad específica de **27.8 U/mg** como se había mencionado anteriormente.

En general, se puede decir que los CLEAs sin albúmina son más activos que los obtenidos en presencia de ésta. Esto puede deberse a que la formación del agregado entrecruzado en presencia de albúmina implica que ésta se ubique de tal forma que genere un impedimento estérico en el sitio activo.

Aunque la mayoría de los experimentos que se observan en la **tabla 9** dan valores de actividades relativas muy superiores a la enzima soluble, en la matriz (0,1,0) se presenta un valor de actividad relativa de **0,007** veces la actividad de la enzima nativa. Si se compara éste último con el resultado para la misma matriz en presencia de albumina (**0,5**), es posible inferir que la seroalbumina de bovino (BSA) no solo actúa como un alimentador proteico, sino que facilita la obtención de enlaces de los agregados enzimáticos (CLEAs) en los casos en donde la concentración de proteínas en el preparado enzimático es baja y/o la actividad de

la enzima es vulnerable a la alta concentración de glutaraldehído necesario para obtener los agregados.⁵⁵

Tabla 9. Matriz de resultados para los agregados entrecruzados de CAL-B en ausencia de albumina.

<i>Experiencia</i> Nº	<i>[Proteína]</i> (mg/mL)	<i>[Ag, precipitante]</i> (%v/v)	<i>[Ag, entrecruzante]</i> (% p/v)	<i>Actividad</i> <i>relativa (%)</i>
1	0	-1	-1	164,3
2	1	1	1	209,52
3	-1	-1	1	98,12
4	0	1	-1	442,83
5	1	-1	1	79,51
6	-1	0	0	50
7	-1	1	0	96,2
8	1	0	-1	15,02
9	1	1	-1	115,02
10	0	1	1	141,43
11	1	-1	-1	20,01
12	-1	1	1	68,57
13	0	-1	0	78,58
14	-1	1	-1	277,86
15	0	0	0	21,42
16	0	0	1	85,67
17	-1	-1	0	50
18	1	-1	0	100
19	1	1	0	870
20	-1	0	1	168,48
21	-1	0	-1	444,75
22	0	1	0	7,13
23	1	0	1	102,51
24	-1	-1	-1	1037,15
25	1	0	0	100
26	0	-1	1	7,89
27	0	0	-1	57,16

El gráfico de Pareto relacionado a estos ensayos experimentales dejó ver claramente que las concentraciones proteína, *t*-butanol y glutaraldehído, ejercen una influencia significativa sobre la actividad específica de los agregados entrecruzados de CAL-B (**Figura 14**).

Por su parte, el análisis de varianza (ANOVA) de los resultados mostrados en la **tabla 9** a través del programa STATGRAPHICS plus 5.1, permitió determinar el grado de significancia de cada uno de los efectos de las variables sobre la

⁵⁵ Shweta, S, Aparna, S. Munishwar N. *Analytical Biochemistry*.2006. (351), 207–213

actividad relativa de los agregados entrecruzados de CAL-B. El valor estadístico P para cada uno de los efectos indica niveles de confiabilidad del 95%. La **tabla 10** resume el análisis de ANOVA.

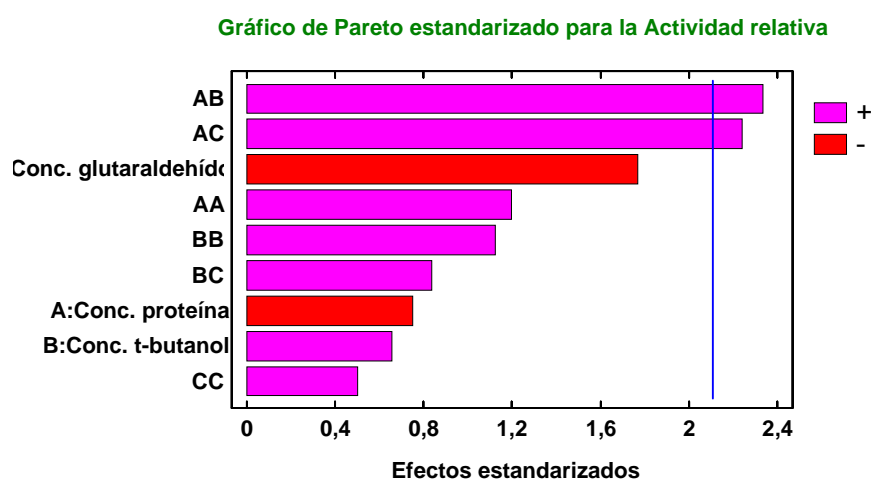


Figura 14. Diagrama de Pareto en la optimización de los agregados entrecruzados de CAL-B en ausencia de albumina.

Tabla 10. Datos de ANOVA para la optimización del CLEA en ausencia de albumina.

VARIABLE	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	P-VALOR
AB	4,49E+04	1	0,0189
AC	3,22E+04	1	0,0436
Error total	1,70E+05	24	
Total (corr.)	2,47E+05	26	

De la **tabla 10** se puede inferir que las interacciones AB y AC presentan valores de P significativos al nivel 0.05, lo cual argumenta que tienen efecto sobre la actividad relativa de los agregados entrecruzados en ausencia de albumina.

Las **figuras 15** y **16** muestran la superficie de respuesta y de contorno para las experiencias con t-butanol como agente precipitante. A través de estos gráficos se estimó la combinación de niveles en los factores que permiten maximizar la actividad específica de los agregados entrecruzados.

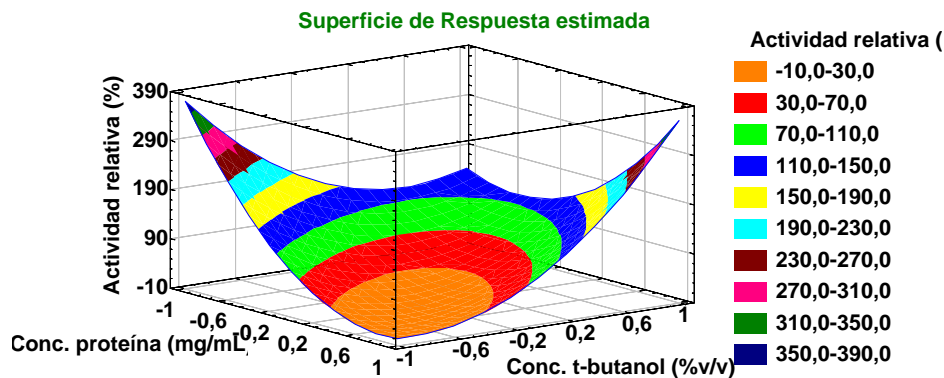


Figura 15. Superficie de respuesta en la optimización de los agregados entrecruzados de CAL-B en ausencia de albumina.

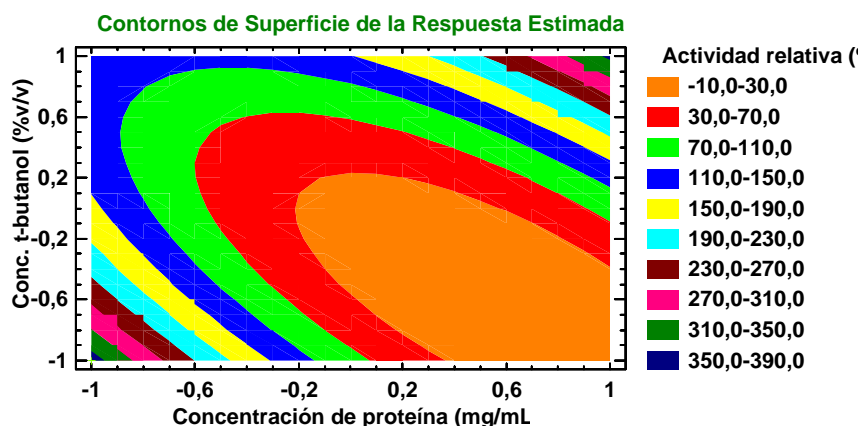


Figura 16. Contorno de superficie de respuesta en la optimización de los agregados entrecruzados de la CAL-B en ausencia de albumina.

Se determinó que para una concentración de proteína de 3 mg/mL, *t*-butanol al 50% (v/v) y de glutaraldehído del 0.5% (p/v), se obtendría la máxima actividad de los agregados entrecruzados en ausencia de albumina. Para la validación de esta aproximación, se elaboraron los agregados entrecruzados de la CAL-B bajo estas condiciones obteniéndose una actividad específica de 1037,15% con lo cual se corroboró el aumento de la actividad del agregado en comparación con la enzima soluble.

3.1.5 Estructura de los agregados entrecruzados enzimáticos.

En las **figuras 17 y 18** se observan los CLEAs óptimos de CAL-B en ausencia y presencia de albumina respectivamente, los cuales fueron escogidos para llevar a cabo los ensayos posteriores.

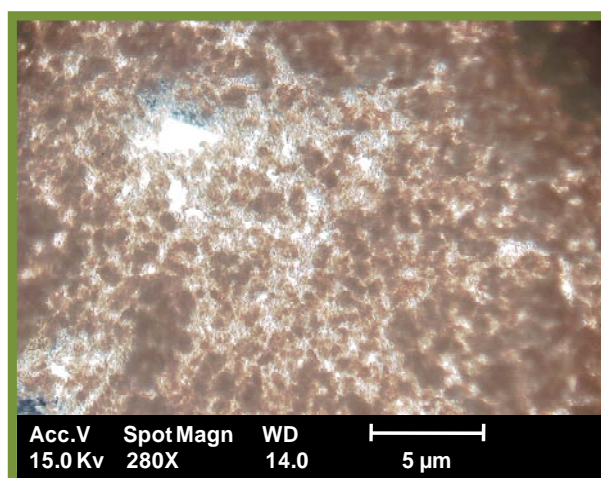


Figura 17. Microscopía confocal del CLEA de CAL-B en ausencia de albumina.

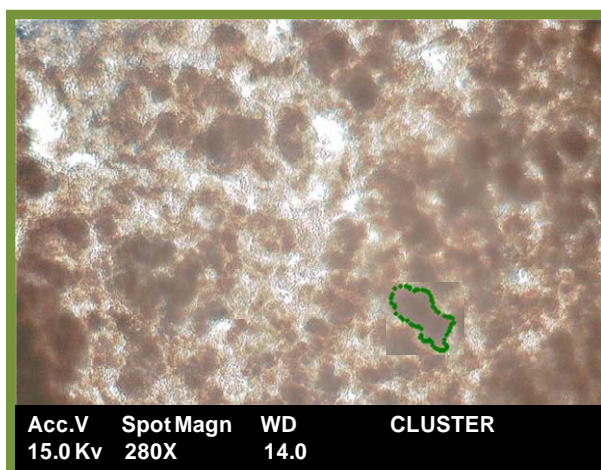


Figura 18. Microscopía confocal del CLEA de CAL-B en presencia de albumina.

Mediante microscopía confocal 3D se logró observar la estructura de los CLEAs óptimos en presencia y ausencia de seroalbumina de bovino. Una de las

particularidades de los CLEAs ha sido relativamente determinar el tipo y tamaño de partícula. Además, el número de moléculas de enzima y la forma en que se pueden empaquetar los agregados tienen una influencia crucial en la actividad de los agregados como un todo.

En las **figuras 17 y 18** podemos apreciar la formación de dos tipos de agregados. En ausencia de albumina el CLEA forma una estructura de Tipo 1 (en forma de bolas) ya que la CAL-B es una enzima altamente lipofílica y tamaño de poro aproximadamente de 1 μm y 5 μm respectivamente. En presencia de albumina se formó la estructura Tipo 2, en la cual las partículas se encuentran en forma de “clusters” que tienen la limitación del transporte de masa y que la cantidad de partículas en el medio de reacción disminuye, esta pudo ser otra consecuencia que en presencia de albumina los CLEAs exhibieran una menor actividad relativa respecto a aquellos en ausencia de albumina, este tipo de CLEA posee tamaños de poros de aproximadamente 100 μm y pueden contener más de cien mil agregados individuales.⁵⁶.

Adicional al estudio por microscopía confocal 3D, el proceso de obtención de los agregados entrecruzados en condiciones óptimas se verificó también por electroforesis SDS-PAGE en geles de policacrilamida. (**Figura 19**).

⁵⁶ Referencia 2

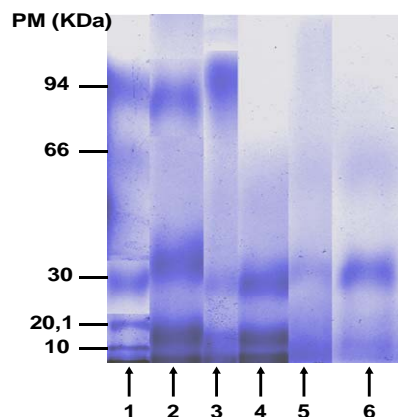


Figura 19. Electroforesis SDS-PAGE de las preparaciones de la lipasa *Candida antarctica B*: Carril 1. Marcador de peso molecular. Carril 2. CAL-B nativa. Carril 3. CLEA de CAL-B con BSA. Carril 4. Sobrenadante de CLEA con BSA. Carril 5. CLEA de CAL-B sin BSA. Carril 6. Sobrenadante de CLEA sin BSA.

3.2 EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA DE LOS AGREGADOS ENTRECruzADOS DE CAL-B ELABORADOS BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS

En la Figura 20 se muestra la cinética de inactivación de los CLEAs óptimos de CAL-B y la CAL-B soluble. Aquí se puede apreciar que los CLEAs de CAL-B conservaron siempre un mismo orden de estabilidad para cada una de las temperaturas, siendo todos más estables que la enzima soluble. El CLEA con mayor estabilidad térmica fue el obtenido en presencia de albumina, destacándose la conservación de su actividad a 70 °C.

La estabilidad térmica que poseen estos agregados enzimáticos se atribuye al entrecruzamiento intermolecular e intramolecular del glutaraldehído con las moléculas de la enzima, lo que ocasiona una conformación estructural más rígida y por tanto le confiere una mayor resistencia térmica a la enzima, es decir a los cambios conformacionales que puedan ser producidos por la temperatura, además su tamaño de partícula también favorece tal estabilidad.⁵⁷

⁵⁷ Referencia 52

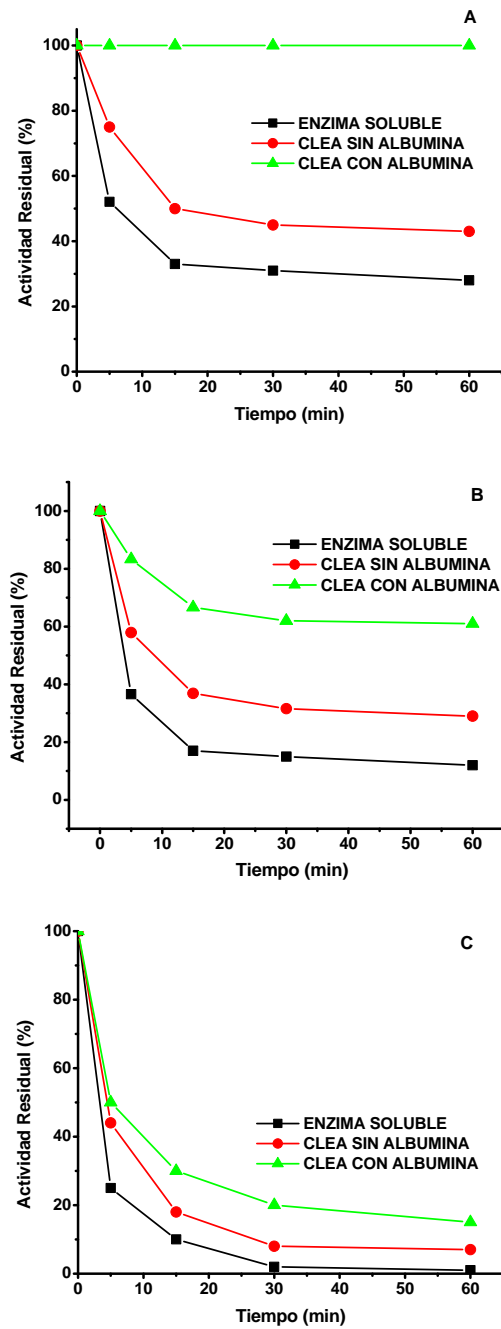


Figura 20. Estabilidad térmica. (■) enzima soluble; (●) CLEA sin albumina; (▲) CLEA con albumina. (A) T=70°C, (B) T=80°C y (C) T=90°C Los experimentos se desarrollaron como se indica en la parte experimental

Al analizar detenidamente las cinéticas de inactivación obtenidas a las diferentes temperaturas estudiadas se encuentra lo siguiente:

- Luego de una hora de incubación a 70 °C el CLEA en ausencia de albumina y la enzima soluble perdieron un 50 % y un 70% de su actividad respectivamente.
- Con el aumento de la temperatura de incubación a 80°C el CLEA en presencia de albumina mantuvo el 60% de su actividad original después de una hora de incubación. Por su parte, la enzima soluble y el CLEA sin albumina conservaron un 10% y un 30% de su actividad respectivamente.
- A la temperatura de 90 °C la enzima soluble se inactiva totalmente perdiendo un 100% de su actividad, mientras que los CLEAs en presencia y en ausencia de albumina retienen un 20% y 5% de su actividad respectivamente.

Puesto que las cinéticas de inactivación térmica de las diferentes especies evaluadas obedecieron una cinética de primer orden, fue posible calcular las constantes de inactivación térmica (**Tabla 11**). Así, los agregados entrecruzados de CAL-B (con albúmina y sin albúmina) resultaron ser 5 y 20 veces más estables que la CAL-B soluble a una temperatura de 90°C, temperatura más alta a que fueron sometidos los diferentes preparados enzimáticos.

Tabla 11. Constantes de inactivación térmica de los CLEAS óptimos de CAL-B. Los experimentos fueron realizados como se indica en la parte experimental.

ENZIMA INMOVILIZADA	$K_{\text{inactivación}} \text{ (min}^{-1}\text{)}$		
	70 °C	80 °C	90 °C
<i>Enzima soluble CAL-B</i>	0,07	0,112	0,277
<i>CLEA de CAL-B con albumina</i>	0,0454	0,063	0,111
<i>CLEA de CAL-B sin albumina</i>	—	0,026	0,076

3.3 ESPECIFICIDAD DE LOS DISTINTOS CLEAs DE CAL-B

3.3.1 Efecto del pH

La primera propiedad catalítica analizada para los distintos agregados enzimáticos de CAL-B fue la actividad específica en la reacción de hidrólisis de mandelato de metilo.

En el caso del CLEA con BSA la actividad específica aumento al aumentar el pH, obteniéndose la mayor actividad a pH 8 con un valor de 7,342 $\mu\text{moles}/\text{min mg}$ CLEA. Para el CLEA sin BSA la mayor actividad presentó un valor de 11,884 $\mu\text{moles}/\text{min mg}$ CLEA, también a pH 8. (**Tabla 12**)

En general, para las diferentes condiciones de pH con excepción de pH 7 (donde el CLEA con BSA fue prácticamente 7 veces más activo que el CLEA sin BSA), el CLEA sin BSA fue siempre más activo que el CLEA con BSA.

Tabla 12. Actividad específica de los CLEAs de CAL-B catalizando la hidrólisis de pNPB y (R)-mandelato de metilo a 25°C a diferentes condiciones de pH. La actividad se definió como: ($\mu\text{mol}/\text{min.mgbiocatalizador}$). El error relativo se estimó en $\pm 3\%$.

CAL-B INMOVILIZADA	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg)			
	pH=5	pH=6	pH=7	pH=8
CLEA con BSA	0,118	0,588	6,928	7,342
CLEA sin BSA	1,56	10,235	1	11,884

El hecho de que el CLEA sin BSA sea más activo en la mayoría de los casos, se puede atribuir a que en este agregado enzimático el sitio activo se encuentra más expuesto en comparación con el CLEA con BSA, el cual, presenta una masa

adicional no catalítica correspondiente a la albúmina. Además, esta proteína que ayuda al entrecruzamiento, puede quizás interponerse entre las moléculas de lipasa de tal forma que restrinja la entrada al sitio activo.

3.3.2 Efecto de la presencia de co-disolvente en el medio de reacción

En la **tabla 13** se muestran las actividades específicas de los dos CLEAs estudiados en presencia de los diferentes solventes en el medio de reacción. Una vez más, el CLEA sin BSA resultó ser en la mayoría de los casos más activo que el CLEA con BSA, siendo la presencia de butanol el caso excepción, en el cual, el CLEA con BSA fue 3,5 veces más activo que el CLEA sin BSA.

Cabe resaltar, que los resultados palpados en la **tabla 13** muestran claramente que la hidrofobicidad del medio de reacción afecta la actividad de los distintos agregados entrecruzados, lo cual es atribuido a un cambio en la forma exacta de la conformación abierta de las moléculas de lipasa, inducido por un cambio en el medio de reacción.

Tabla 13. Actividad específica de los CLEAs de CAL-B catalizando la hidrólisis de pNPB y (R)-mandelato de metilo a 25°C en diferentes solventes al 10% (v/v). La actividad se definió como: ($\mu\text{mol}/\text{min.mgbiocatalizador}$). El error relativo se estimó en $\pm 3\%$.

CAL-B INMOVILIZADA	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg)			
	ETANOL	ISOPROPANOL	BUTANOL	t-BUTANOL
CLEA con BSA	0,0174	1,83E-04	0,226	0,01
CLEA sin BSA	0,535	1,218	0,064	0,256

En este caso la mayor actividad se presentó con el CLEA sin BSA con el medio de reacción en presencia de isopropanol (1,218 $\mu\text{moles}/\text{min mg}$ CLEA).

3.4 ENANTIOSELECTIVIDAD DE LOS DIFERENTES CLEAs CAL-B EN LA HIDRÓLISIS DE MANDELATO DE METILO.

3.4.1 Efecto del pH

La propiedad catalítica más interesante de las lipasas es la enantioselectividad frente a sustratos quirales. En este caso, analizamos el efecto de la inmovilización por entrecruzamiento sobre la enantioselectividad de la lipasa de *C. antarctica B* en la hidrólisis de (\pm)-mandelato de metilo.

En las diferentes condiciones de pH estudiadas (5, 6, 7 y 8) todos los derivados inmovilizados presentaron una preferencia estereoquímica similar hidrolizando el isómero R, con excepción de la condición de pH 6, en la que el derivado enzimático con BSA prefirió el isómero S sobre el R. (**Tabla 14**).

El CLEA con BSA fue altamente enantioselectivo a pH 6 y 8, con una enantioselectividad de 130 y 54 respectivamente. Esto deja en claro que modificar el pH no sólo puede afectar la enantioselectividad sino también la enantiopreferencia de las lipasas. Además, llevar a cabo la reacción de hidrólisis bajo estas condiciones de pH, permitió obtener a pH 6 el enantiómero S del ácido mandélico con un ee del 98%, y a pH 8 el enantiómero R del ácido mandélico con un ee del 96%.

Tabla 14. Enantioselectividad de los CLEAs óptimos de CAL-B en la hidrólisis de (\pm)-mandelato de metilo a 25°C y diferentes condiciones de pH.

CAL-B INMOVILIZADA	pH=5			pH=6			pH=7			pH=8		
	ee	E	*EP	ee	E	*EP	ee	E	*EP	ee	E	*EP
CLEA con BSA	68	5	R	98	130	S	42	3	R	96	54	R
CLEA sin BSA	99	192	R	66	6	R	58	4,3	R	49	3,4	R

Por su lado, el CLEA sin BSA fue el más enantioselectivo ($E=192$, pH 5), permitiendo obtener el R-ácido mandélico con un ee del 99%.

Las otras condiciones de pH estudiadas para los distintos CLEAs conllevaron a valores de enantioselectividad por debajo de lo aceptable ($E<20$).

3.4.2 Efecto de la presencia de co-disolvente en el medio de reacción.

La presencia de cierta cantidad de co-disolvente en el medio de reacción fue otro factor que influyó sobre la enantioselectividad de los diferentes agregados enzimáticos.

La **tabla 15** muestra las enantioselectividades de los distintos agregados de CAL-B frente a diferentes solventes al 10% en el medio de reacción. En presencia de etanol, isopropanol y t-butanol, ambos CLEAs presentaron la misma enantiopreferencia hidrolizando el isómero S. Mientras en presencia de butanol, ambos agregados enzimáticos hidrolizaron preferiblemente el isómero R, aunque en este caso la enantioselectividad resultó por debajo de lo aceptable.

Si nos centramos en los solventes en que se obtuvieron mejores resultados, parece ser que al disminuir la polaridad del solvente hay un aumento considerable de la enantioselectividad de ambos CLEAs. Esto se debe también a que la hidrofobicidad juega un papel importante en la forma exacta de la conformación abierta de las moléculas de lipasa, modificando sus propiedades catalíticas, en este caso la enantioselectividad de los agregados enzimáticos de CAL-B.

Así, los resultados obtenidos en presencia de etanol, isopropanol y t-butanol, son valores de enantioselectividad mayores de lo aceptable ($E>20$), destacándose el CLEA con BSA con una enantioselectividad de 435 en presencia de t-butanol y 288 en presencia de isopropanol, seguido del CLEA sin BSA con una

enantioselectividad de 233 en presencia de t-butanol y 97 en presencia de isopropanol. En estos dos solventes, el CLEA con BSA fue más enantioselectivo que el CLEA sin BSA, ocurriendo lo contrario en presencia de etanol, siendo más enantioselectivo el CLEA sin BSA (E=30) que el CLEA con BSA (E=27).

Tabla 15. Enantioselectividad de los CLEAs óptimos de CAL-B en la hidrólisis de (±)-mandelato de metilo a 25°C y diferentes solventes orgánicos al 10% (v/v).

CAL-B INMOVILIZADA	ETANOL			ISOPROPANOL			BUTANOL			t-BUTANOL		
	ee	E	*EP	ee	E	*EP	ee	E	*EP	ee	E	*EP
<i>CLEA con BSA</i>	91	27	S	99	288	S	70	6	R	99	435	S
<i>CLEA sin BSA</i>	91	30	S	96	97	S	71	7,3	R	99	233	S

CONCLUSIONES

- El t-butanol fue el agente precipitante óptimo, el cual conllevó a la obtención de CLEAs exhibiendo actividades relativas mayores a la de los CLEAs obtenidos utilizando el sulfato de amonio y DME. Esto fue atribuido a las interacciones hidrofóbicas de dicho solvente con las moléculas de lipasa, favoreciendo la conformación abierta.
- La combinación de niveles en los factores permitió optimizar la elaboración de los agregados entrecruzados. Se determinó que para una concentración de proteína de 3 mg/mL, concentración de agente precipitante al 50 % (v/v) y concentración de glutaraldehído al 1.5 y 0.5% (p/v), en presencia y ausencia de BSA respectivamente, se obtendría la máxima actividad relativa de los agregados entrecruzados, **296.25%** y **1037.15%** en el mismo orden.
- Los agregados entrecruzados de CAL-B elaborados bajo condiciones óptimas presentaron un aumento de la actividad relativa con factores de 10 y 3 veces respecto a la enzima soluble en ausencia y presencia de BSA respectivamente.
- Los agregados entrecruzados de CAL-B presentaron una estabilidad térmica superior a la de la enzima soluble. EL agregado enzimático con BSA incubado a una temperatura de 70°C conservó totalmente su actividad original. Además, al aumentar la temperatura hasta 90°C los CLEAs mantuvieron el 20% de su actividad, mientras la enzima soluble se inactivó completamente.

- La enzima BSA actúa como un alimentador proteico en la elaboración de agregados entrecruzados favoreciendo la precipitación de la CAL-B. Además, ayuda a la formación de “cluster” en la estructura de los CLEAs de CAL-B, lo cual le confiere una estabilidad térmica mayor que la de la enzima soluble y del CLEA sin BSA.
- Aumentar la hidrofobicidad del solvente en el medio de reacción conllevó a un aumento de la enantioselectividad de los dos CLEAs estudiados. En el mejor de los casos se tuvo una enantioselectividad de **435**, obteniendo el (S)- ácido mandélico con un ee del **99%** (CLEA con BSA y *t*-butanol como co-disolvente). Cabe añadir, que para las reacciones llevadas a cabo en presencia de solvente la enantiopreferencia fue la misma, hacia el S enantiómero.
- En las diferentes condiciones de pH, en general todos los CLEAs de CAL-B presentaron una preferencia estereoquímica similar, hidrolizando el isómero R del Mandelato de metilo. El CLEA sin BSA a pH= 5.0 fue el más enantioselectivo (**E=192**), permitiendo obtener el R-ácido mandélico con un exceso enantiomérico del **99%**.
- Todos los resultados obtenidos sugieren que las propiedades de la CAL-B pueden ser fuertemente moduladas mediante lo que denominamos “ingeniería conformacional”: inmovilización dirigida (alterando la rigidez, la orientación y el microambiente) e ingeniería del medio.

RECOMENDACIONES

Las Lipasas se encuentran entre las enzimas más relevantes en química orgánica debido su amplia especificidad por sustratos no naturales, lo cual contrasta con una alta enatio- y regioselectividad, Por esta razón, los métodos de inmovilización como la elaboración de agregados entrecruzados (CLEAs) requieren de estudios más a fondo que le permitan a la enzima una alta estabilidad frente a parámetros como el pH, solventes orgánicos y la temperatura. Algunos de los que se proponen en esta tesis son los siguientes:

- El uso de polímeros iónicos como la polietilendiamina en la elaboración de agregados entrecruzados, realizando una co-precipitación de la enzima CAL-B que produciría dos efectos en la lipasa: (i) un doble cambio en el microambiente por el alto efecto salino de el polímero y (ii) reduce la movilidad de la estructura de la enzima causada por las interacciones enzima-polímero y entrecruzamiento. Evaluando la actividad y enantioselectividad de estos CLEAs sobre sustratos de interés farmacéutico, así como su estabilidad a la temperatura y/o solventes orgánicos.
- La elaboración, optimización y caracterización de combiCLEAs de lipasa CAL-B con otras lipasas como la lipasa de *Candida rugosa*, determinando su capacidad biocatalítica en la resolución cinética de compuestos racémicos con actividad biológica y de interés en la industria farmacéutica.

REFERENCIAS

Sheldon, R.A.; Schoevaart, R.; et al. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, (87:6), 754-762.

Cao, L.; Van Rantwijk; Sheldon, R.A.; *Organic letters.* **2000** (2:10), 1361-1364.

Mateo, C.; Fernández-Lorente, G.; Abian, A.; et al. *Biomacromolecules.* **2000**, (1), 739-745.

Cao, L.; Van Rantwijk, F.; Sheldon, R.; Van Langen, L.J. *of mol. catalysis B: Enzymatic* **2001**, 665-670.

Palomo, J.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C; et al. *Enzyme and Microbial Technology.* **2002**, (31), 775-783.

Cao, L.; Van Rantwijk, F.; Sheldon, R.; Lopez-Serrano, P. *Biotechnology letters.* **2002**, (24), 1379-1383.

Moira, L.; Van Rantwijk, F.; Sheldon, R. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, (84:6).

Wilson, L.; Betancor, L.; Fernandez-Lorente, M. *Biomacromolecules.* (**2004**) (5:3)

Fernández Lorente, G.; Ortiz, C.; Segura, R.; et al. *Wiley Periodicals, Inc.* **2005**, 773-779.

Othman, S.; Basri, M.; Hussein, M.; et al. *Food Chemistry.* **2008**, 106, 437-443.

Escorcia, A.; Torres, R.; Ortiz, C.. *Resolución cinética de (R,S)-mandelato de metilo utilizando preparaciones inmovilizadas de lipase C. antártica B.* **2008**.

Wilson L, Illanes A, Soler L, Henriquez MJ, *Process Biochemistry*.**2008**, (10),1-19

Cao, L.; Van Langen, L.; Sheldon, R. *Curr opin Biotechnol.* **2004**, (14:4), 387-394.

Amotz,S. Novo Industry A/S. **1987**, (4), 664-665

Doscher, M.S. and Richards, F.M.*J. Biol. Chem.*, **1963**, (238), 2399–2406.

Quiocho, F.A. and Richards, F.M., *Proc. Natl. Acad. Soc. USA*, **1992**. (114), 7314–7316.

St,Clair, N.L. and Navia, M.A, *J. Am. Chem.Soc.*, **1992**, (114), 7314–7316,

Margolin, A.L., *Novel crystalline catalysts, Tibtech.*, **1996**,(14), 223–230,

Migneault, I.; Dartiguenave, C. “. *Biotechniques*. **2004**, (37), 790-802.

Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R. *Chemistry and Physics of Lipids*. **1998**, 93, 67-80.

Sarda, L. ; Desnuelle, P. *Biochim. Biophys. Acta*. **1958**,30, 513-521

Reetz, M. T.; Rüggeberg, C. J.; Dröge, M. J.; Quax, W. *J. Tetrahedron*. **2002**, 58, 8465-8473.

Sobolev, A.; Franssen, M.C.R.; Poikans, J.; Duburs, G.;de Groot, *Tetrahedron*.**2002**,(13), 2389-2397.

Chen, C.-S.; Wu, S.-H.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 2812-2817.

Segundo, F.; Carrea, G.; Tarabiono, C.; et al. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* **2006**, 39, 166-170.

Sarda, L. ; Desnuelle, P. *Biochim. Biophys. Acta.* **1958**, (30), 513-521

Derewenda, U.; Brzozowski, A.M.; Lawson, D. M.; Derewenda, Z.S. *Biochemistry.* **1992**,(31), 1532-1541.

Palomo, J.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; et al. *Tetrahedron: Asymmetry.* **2002**, 13, 1337-1345.

Palomo, J.; Muñoz G.; Fernández-Lorente, G.; et al. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* **2003**, 21, 201-210.

Palomo, J.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C; et al. *Enzyme and Microbial Technology.* **2002**, 31, 775-783.

Nara, S. J.; Harjani, J. R.; Maikrao, M.M; Salunkhe, M. *Tetrahedron Letters.***2003**, (44), 1371-1373.

Ghosh,D.; Wawrzak, Z.; Pletnev, V.Z.; Li,N.; Kaiser, R.; Pangborn. *W.Structure.***1995**,(3),279-288.

Pernas, M.A.; López, C.; Rúa, M.L.; Hermoso, J. *FEBS. Lett.* **2001**,501, 87-91.

Rúa, M.L.; Schmidt-Dannert, C.;Wahl, S.; Sprauer, A.; Schmid, R.D. *J. Biotechnol.* **1997**, 56, 89-102.

Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S.; Jones, T. *Biochemistry*. **1994**, 2, 293-308.

Anderson, E. M.; Larson, K. M.; Kirk*, O. *Biocatal. Biotransform.* **1998**, 16, 181-204.

Ghanem, Ashraf; Hassan, Y.; Enein, Aboul. *Tetrahedron Asymmetry*. **2004**, 78, 3331-3351.

Grover, P. T.; Bhongle, N. N.; et al. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 6283-6287

Kazuhiko, T.; Kazuo, O.; et al. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, 40, 1415-1423

Fang, X. P.; Anderson, S. E.; et al. *J. Nat. Prod.* **1991**, 54, 1034-1043.

Tsubuki, M.; Kanai, K.; Honda, T. *J. Chem. Soc.* **1992**, 1640-1641. (b) Yang, Z. C.; Zhou, W. S. *Heterocycles*. **1997**, 45, 367-383.

Mukai, C.; Hirai, S.; Hanaoka, M. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6619-6626.

Tsubuki, M.; Kanai, K.; Honda, T. *Synlett*. **1993**, 653-655.

Xu, D.; Sharpless, K. B. *Tetrahedron lett.* **1994**, 35, 4685-4688.

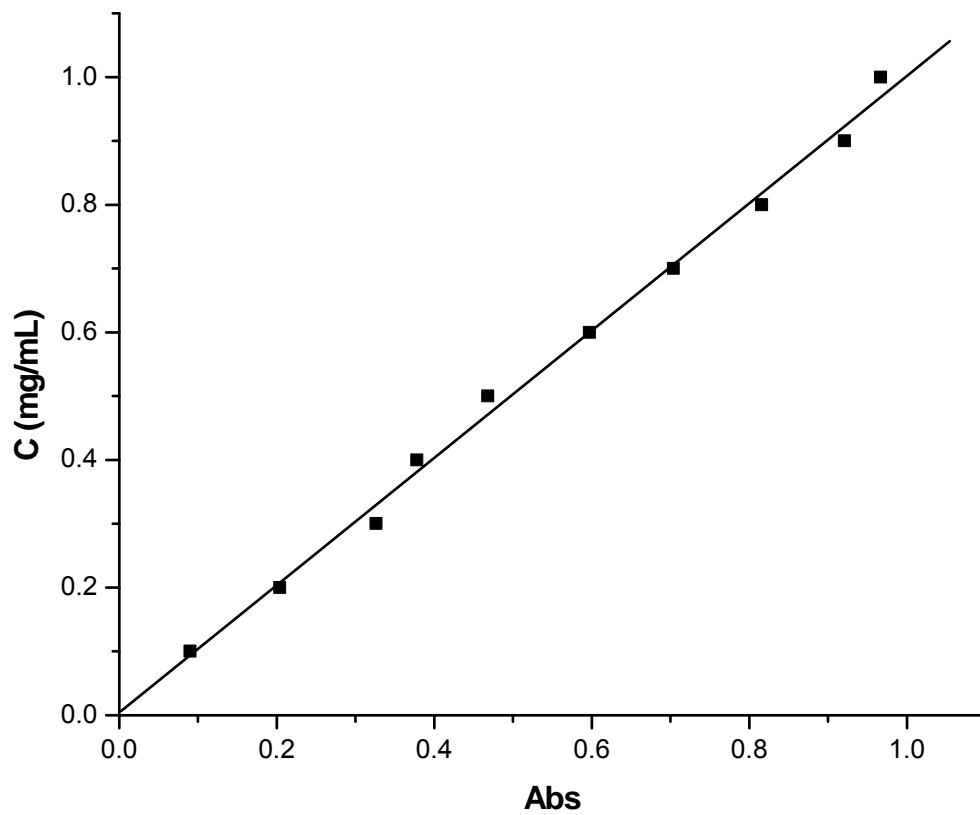
Bradford, M. *Anal. Biochem.* **1976**. (72), 248-254.

Brown, G.B. "Chemically aggregated enzymes", *Methods in enzymology, academic press*. (1976)

Shweta, S, Aparna, S. Munishwar N. *Analytical Biochemistry*. **2006**. (351), 207–213

ANEXO A

Curva de calibración para la determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford.

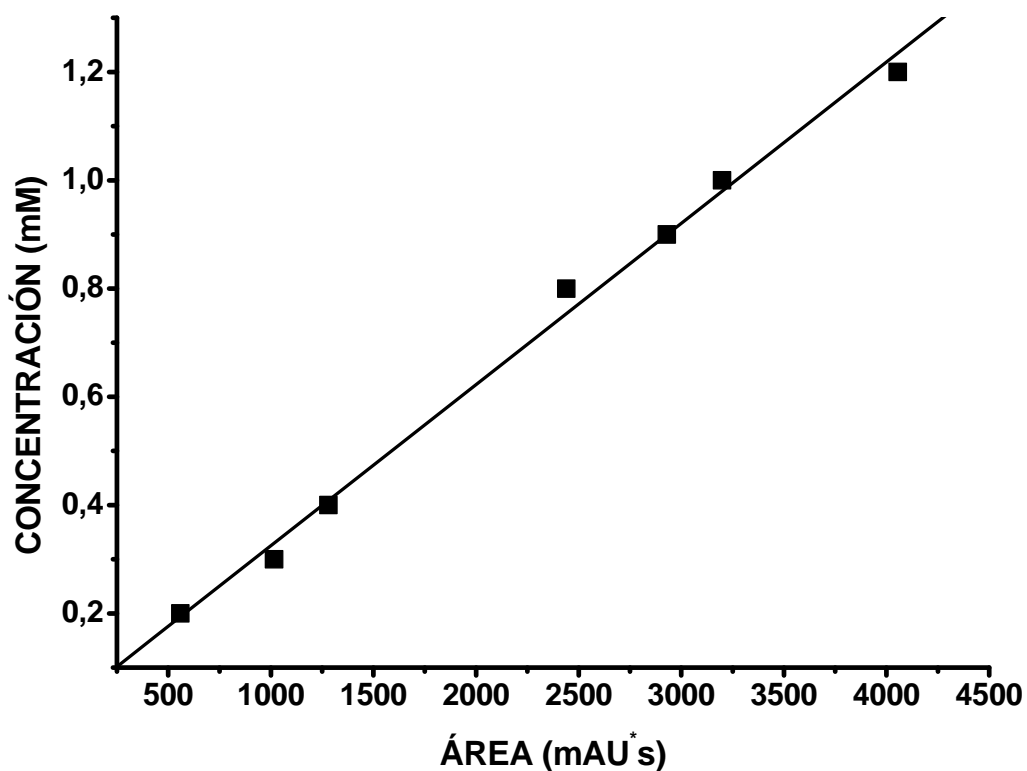


$$C = 0,998 \cdot Abs + 0,002$$

Donde C es la concentración de proteína en mg/mL y A es la absorbancia a 595 nm.

ANEXO B

Curva de calibración para la cuantificación del grado de hidrólisis del Mandelato de metilo.



$$C = 0,0004 A - 0,1992$$

C es la concentración de [(RS)-, (R)- y (S)-] mandelato de metilo en mM y A es el área del pico correspondiente para el mandelato en mAU*s.

ANEXO C

Las constantes de inactivación térmica se obtuvieron asumiendo un modelo cinético de primer orden:

$$E = E_0 e^{-K_t t}$$

$$a = \frac{E}{E_0}$$

$$a = e^{-K_t t}$$

Donde

a: Actividad volumétrica en U/ml del extracto enzimático

K: constante de inactivación en unidades de min⁻¹

t: Tiempo de incubación para cada temperatura

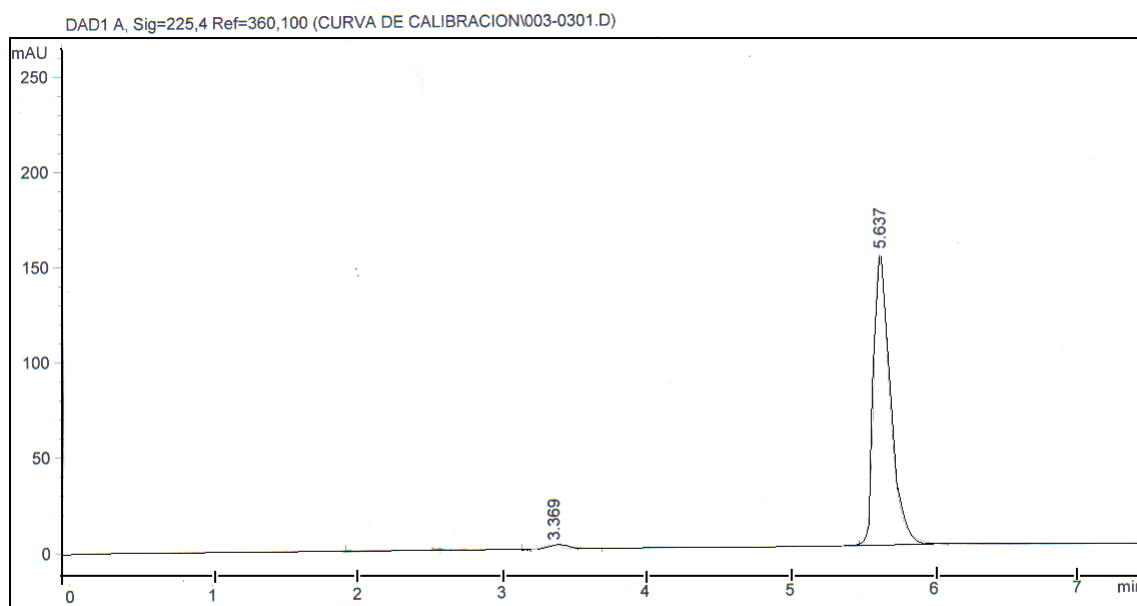
Para hacer posible el cálculo de la constante se procedió a realizar la linealización de la curva

$$\ln(a) = -K_t t$$

Donde la pendiente de esta curva corresponde a las constantes de inactivación térmica.

ANEXO D

Cromatograma del (R,S)-Ácido mandélico ($t_R = 3.369$ min) y (R,S)-Mandelato de metilo ($t_R = 5.637$ min).



=====
=====
Area Percent Report
=====
=====