

**EVALUACIÓN DE LA ENANTIOSELECTIVIDAD DE DERIVADOS
MODIFICADOS DE LIPASAS DE CANDIDA RUGOSA Y
ALCALIGENES SP. EN LA RESOLUCIÓN CINÉTICA DE (R/S)-
MANDELATO DE METILO**

LAURA CAROLINA TARAZONA SEPÚLVEDA

**Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ciencias
Escuela de Química
Bucaramanga
2011**

**EVALUACIÓN DE LA ENANTIOSELECTIVIDAD DE DERIVADOS
MODIFICADOS DE LIPASAS DE CANDIDA RUGOSA Y
ALCALIGENES SP. EN LA RESOLUCIÓN CINÉTICA DE (R/S)-
MANDELATO DE METILO**

LAURA CAROLINA TARAZONA SEPÚLVEDA

**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

2011

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme dado todas esas bendiciones que han llenado mi vida de infinita felicidad.

A mis Padres por haberme proporcionado tanto amor y apoyo incondicional durante todo este proceso. Los admiro de corazón.

A mi profesor Rodrigo, que me brindo sus aportes de manera excepcional, siempre guiándome para culminar con éxito esta gran etapa.

A la profesora Claudia, por todas sus contribuciones para mejorar diferentes aspectos de este trabajo.

A todo el Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología, por toda la colaboración recibida que hizo posible la realización de este trabajo

A Miguel, por estar siempre a mi lado, por ser el amor de mi vida y convertirse en mi ángel.

Y por último, pero no menos importante a mi gran amiga Mónica, que con su especial compañía siempre estuvo apoyándome y brindándome todos sus consejos.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	17
1 MARCO DE REFERENCIA	19
1.1 Lipasas	19
1.2 Activación interfacial de las lipasas	21
1.3. Modulación de las propiedades catalíticas de las lipasas	21
1.4 Ingeniería de proteínas	22
1.4.1 Aminación	23
1.4.2 Succinilación	24
1.5 Ingeniería del derivado	25
1.5.1 Inmovilización de enzimas	26
1.5.1.1 Inmovilización sobre soporte hidrofóbico	27
1.5.1.2 Inmovilización sobre soporte epoxiacrílico	28
1.5.2 Insolubilización por entrecruzamiento de agregados Enzimáticos (CLEAs)	29
1.6 Resolución cinética catalizada por lipasas	32
1.6.1 Enantioselectividad de las lipasas	33
1.6.2 Métodos para la determinación del exceso enantiomérico.	35

2.	MATERIALES Y METODOS	37
2.1	Materiales	37
2.2	Metodología experimental	37
2.2.1	Purificación del extracto crudo de lipasas CRL y QL	38
2.2.2.	Modificación química de CRL y QL	38
2.2.2.1	Modificación por succinilación	38
2.2.2.2	Modificación por aminación	39
2.2.3	Inmovilización de lipasas modificadas (CRL-S y QL-S) sobre soporte EC-EDA	39
2.2.4	Insolubilización de lipasas modificadas (CRL-A y QL-A) por entrecruzamiento de agregados enzimáticos	40
2.2.5	Evaluación de la estabilidad térmica de los derivados Inmovilizados sobre soporte y derivados entrecruzados	41
2.2.6	Hidrólisis del mandelato de metilo catalizada por los derivados modificados de CRL y QL	42
2.3	Metodología analítica	42
2.3.1	Determinación de la actividad lipásica utilizando p-NPB	42
2.3.2	Determinación de la concentración de proteína	43
2.3.3	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS PAGE	43
2.3.4	Análisis por HPLC	43
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
3.1	Purificación del CRL y QL, por cromatografía de adsorción interfacial	45

3.2	Modificación química de las enzimas CRL y QL purificadas a través de la reacción de Succinilación	48
3.3	Inmovilización de las enzimas CRL y QL succiniladas, sobre soportes Eupergit C aaminados (EC-EDA)	50
3.4	Modificación química de las enzimas CRL y QL, a través de la reacción de Aminación.	53
3.5	Insolubilización de lipasas modificadas (CRL-A y QL-A) por entrecruzamiento de agregados enzimáticos (CLEAs)	55
3.5.1	CLEA de CRL-A	55
3.5.2	CLEA de QL-A	60
3.6	Estabilidad térmica de los derivados enzimáticos (EC-EDA-CRL-S, EC-EDA-QL-S, CLEA-CRL-A y CLEA-QL-A)	65
3.6.1	Estabilidad térmica de EC-EDA-CRL-S y EC-EDA-QL-S	65
3.6.2	Estabilidad térmica del CLEA-CRL-A y CLEA-QL-A	70
3.7	Hidrólisis del (R/S)-mandelato de metilo catalizada por los derivados modificados de CRL y QL	76
3.7.1	Actividad catalítica de los derivados modificados de CRL y QL en la hidrólisis del mandelato de metilo	76
3.7.2.	Enantioselectividad de los distintos derivados de CRL y QL catalizando la hidrólisis de mandelato de metilo	78
4.	CONCLUSIONES	81
5.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
6.	ANEXOS	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Hidrólisis de triglicéridos	19
Figura 2.	Conformación abierta y cerrada de la lipasa	20
Figura 3.	Equilibrio de las lipasas en medio acuoso	21
Figura 4.	Reacción de aminación	23
Figura 5.	Pasos de reacción; activación del grupo carboxílico, posterior ataque nucleofílico	24
Figura 6.	Reacción de succinilación	25
Figura 7.	Inmovilización sobre soportes epóxido.	28
Figura 8.	Etapas de entrecruzamiento de agregados enzimáticos	30
Figura 9.	Resolución cinética catalítica	32
Figura 10.	Procedimiento para la elaboración de CLEAs	41
Figura 11.	Cinética de la inmovilización de CRL en Octil-Agarosa.	46
Figura 12.	Cinética de la inmovilización de QL en Octil-Agarosa	47
Figura 13.	Electroforesis SDS-PAGE de las preparaciones de la lipasa de <i>C.rugosa</i> y <i>Alcaligenes sp.</i>	48
Figura 14.	Cursos de inmovilización de CRL succinilada sobre EC-EDA	51
Figura 15.	Cursos de Inmovilización de QL succinilada sobre EC-EDA	51
Figura 16.	Diagrama de Pareto en la optimización de los agregados entrecruzados de CRL-aminada.	58

Figura 17.	Superficie de respuesta en la optimización de los agregados entrecruzados de CRL-aminada.	59
Figura 18.	Contorno de superficie de respuesta en la optimización de los agregados entrecruzados de la CRL-aminada.	60
Figura 19.	Diagrama de Pareto en la optimización de los agregados entrecruzados de QL-aminada.	62
Figura 20.	Superficie de respuesta en la optimización de los agregados entrecruzados de CRL-aminada.	63
Figura 21.	Contorno de superficie de respuesta en la optimización de los agregados entrecruzados de la CRL-aminada.	63
Figura 22.	Estabilidad térmica de EC-EDA CRL-S. A) 70°C, B) 80°C y C) 90°C.	66
Figura 23.	Estabilidad térmica de EC-EDA-QL-S. A) 70°C, B) 80°C y C) 90°C.	69
Figura 24.	Estabilidad térmica de CLEA-CRL-A. A) 70°C, B) 80°C y C) 90°C	71
Figura 25.	Estabilidad térmica de CLEA-QL-A. A) 70°C, B) 80°C y C) 90°C.	74
Figura 26.	Comparación de las actividades relativas de los derivados enzimáticos a 1h de incubación	75
Figura 27.	Cinética de la reacción de hidrólisis de (R/S)-Mandelato de metilo catalizada por derivados modificados de CRL y QL	77
Figura 28.	Hidrólisis enantioselectiva del (R/S)-mandelato de metilo	79

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Actividades de los extractos enzimáticos succinilados	49
Tabla 2.	Rendimiento de inmovilización y Actividades expresadas para cada uno de los derivados evaluados	52
Tabla 3.	Actividades de los extractos enzimáticos aminados	54
Tabla 4.	Condiciones experimentales en la selección de variables significativas para la optimización de CLEAs	56
Tabla 5.	Matriz de resultados de la elaboración de los agregados entrecruzados en la optimización del grado de modificación, concentración del agente precipitante y agente entrecruzante.	57
Tabla 6.	Datos de ANOVA para la optimización del CLEA de CRL-aminada	59
Tabla 7.	Matriz de resultados de la elaboración de los agregados entrecruzados en la optimización del grado de modificación, concentración del agente precipitante y agente entrecruzante.	61
Tabla 8.	Datos de ANOVA para la optimización del CLEA de QL Aminada	62
Tabla 9.	Actividad relativa para los CLEAS optimizados de CRL Y QL aminadas	64

Tabla 10.	Constantes de inactivación térmica de CRL soluble, CRL succinilada y de EC-EDA-CRL-S	67
Tabla 11.	Constantes de inactivación térmica de QL soluble y de EC-EDA-QL-S	69
Tabla 12.	Constantes de inactivación térmica de CRL soluble, CRL aminada y del CLEA-CRL-A.	72
Tabla 13.	Constantes de inactivación térmica de QL soluble y del CLEA-QL-A.	74
Tabla 14.	Actividad específica derivados de CRL y QL, catalizando la hidrólisis (S)-mandelato de metilo a 25°C a pH 7.	78
Tabla 15.	Enantioselectividad de los derivados inmovilizados de CRL y QL en la hidrólisis de (±)-mandelato de metilo a 25°C y pH 7.	79

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Métodos de inmovilización de lipasas.	27
Esquema 2.	Diagrama de flujo para la metodología.	37

ABREVIATURAS

CRL	Lipasa de <i>Candida rugosa</i>
QL	Lipasa QL de <i>Alcaligenes sp.</i>
p-NPB	p-Nitrofenilbutirato
EDA	Etilendiamina
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida
EC	Soporte Eupergit C
EC-EDA	Soporte Eupergit C modificado con grupos amino
CLEAs	Agregados enzimáticos entrecruzados
CRL-A	Lipasa de <i>Candida rugosa</i> aminada
QL-A	Lipasa QL de <i>Alcaligenes sp.</i> aminada
CRL-S	Lipasa de <i>Candida rugosa</i> succinilada
QL-S	Lipasa QL de <i>Alcaligenes sp.</i> succinilada
EC-EDA-CRL-S	Lipasa de <i>Candida rugosa</i> succinilada inmovilizada en soporte Eupergit C aminado
EC-EDA-QL-S	Lipasa QL de <i>Alcaligenes sp.</i> succinilada inmovilizada en soporte Eupergit C aminado
CLEA-CRL-A	Agregado entrecruzado de <i>Candida rugosa</i> aminada
CLEA-QL-A	Agregado entrecruza de lipasa <i>Alcaligenes sp.</i> aminada

RESUMEN

TITULO: EVALUACIÓN DE LA ENANTIOSELECTIVIDAD DE DERIVADOS MODIFICADOS DE LIPASAS DE *Candida rugosa* y *Alcaligenes* sp. EN LA RESOLUCIÓN CINÉTICA DE (R/S)-MANDELATO DE METILO*

AUTOR: TARAZONA SEPULVEDA, Laura Carolina **

PALABRAS CLAVES: Succinilación, aminación, inmovilización covalente, CLEAs, (R/S)-mandelato de metilo

Las enzimas actúan en condiciones suaves de reacción compatibles con las características de una célula, lo cual puede representar un atractivo económico para su uso en la industria ya que se reducen los costos energéticos del proceso. Sin embargo, las enzimas presentan algunas limitaciones, tales como inestabilidad en condiciones drásticas de pH, presión, temperatura y el uso de solventes orgánicos. Es por esto que se han desarrollado diferentes estrategias para aumentar la estabilidad y mejorar las propiedades catalíticas. Entre estas, se encuentran técnicas dentro de la ingeniería de proteínas y la ingeniería del derivado. En este trabajo, las lipasas *Candida rugosa* (CRL) y *Alcaligenes* sp. (QL), fueron purificadas, modificadas mediante succinilación e inmovilizadas en soportes epóxido Eupergit C activado con grupos amino (EC-EDA-CRL-S y EC-EDA-QL-S). Las mismas lipasas se modificaron mediante aminación y se insolubilizaron por la técnica de CLEAs (CLEA-CRL-A y CLEA-QL-A). A los derivados enzimáticos obtenidos se les evaluó su estabilidad térmica. Cada uno de estos derivados inmovilizados presentaron diferentes estabilidades destacándose la técnica de inmovilización en EC-EDA ya que le confiere mayor rigidez a la lipasa. Asimismo, se evaluaron las propiedades catalíticas (actividad y enantioselectividad) en la resolución de (R/S)-mandelato de metilo. Los resultados obtenidos mostraron que el derivado EC-EDA-CRL-S fue el más enantioselectivo con E=14 permitiendo obtener el enantiómero S del ácido mandélico.

* Proyecto de grado.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. TORRES SÁEZ, Rodrigo. ORTIZ LOPEZ, Claudia.

ABSTRACT

TITLE: EVALUATION OF ENANTIOSELECTIVITY OF MODIFIED DERIVATIVES OF CANDIDA RUGOSA LIPASE AND ALCALIGENES SP. IN KINETIC RESOLUTION OF (R / S)-METHYL MANDELATE*

AUTHOR: TARAZONA SEPULVEDA, Laura Carolina **

Keywords: Succinylation; Amination; Covalent immobilization; CLEAs; (R/S)-methyl mandelate.

The enzymes act in mild reaction conditions compatible with the characteristics of a cell, which may represent an economically attractive for its use in the industry, because it reduces energy costs in the process. However, the enzymes have some limitations, such as instability in drastic conditions of pH, pressure, temperature and the possible use of organic solvents. That is why some investigations have developed different strategies to increase stability and improve the catalytic properties. Among these techniques, we found protein engineering and engineering of the derivative. In this study, *Candida rugosa lipase (CRL)* and *Alcaligenes sp. (QL)* were purified, modified by succinylation reaction and covalently immobilized on EC-EDA, epoxy supports activated with amino groups (EC-EDA-CRL-S and EC-EDA-QL-S). These lipases were also modified by amination reaction and immobilized by the technique of CLEAs (CLEA-CRL-A and CLEA-QL-A). The derivatives obtained were evaluated for their thermal stability. Each one of these derivatives showed different stabilities; EC-EDA was highly stable this is due to *rigidification* of the *lipase*. Also, the catalytic properties (activity and enantioselectivity) were evaluated in the resolution of (R / S)-methyl mandelate. The obtained results showed that the EC-EDA-CRL-S was the most enantioselective derivated with E = 14 allowing to obtain the S-enantiomer of mandelic acid.

* Graduation Project.

** Science Faculty. Chemistry School. TORRES SÁEZ, Rodrigo. ORTIZ LÓPEZ, Claudia.

Introducción

Las enzimas catalizan una gran variedad de reacciones de transformación de sustratos orgánicos naturales y sintéticos. Poseen una elevada especificidad, y regio- enantioselectividad, lo cual las convierte en catalizadores ideales para llevar a cabo reacciones de biosíntesis orgánica. Por otro lado, las enzimas actúan en condiciones suaves de reacción compatibles con las características de una célula, lo cual puede representar un atractivo económico para su uso en la industria ya que se reducen los costos energéticos del proceso. Sin embargo, las enzimas presentan algunas limitaciones, tales como inestabilidad en condiciones drásticas de pH, presión y temperatura.

Teniendo en cuenta la importancia de la utilización de las enzimas en procesos industriales, se han desarrollado diferentes estrategias para aumentar la estabilidad y mejorar las propiedades biocatalíticas. Una de las estrategias más estudiadas en el grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología es la inmovilización de proteínas. De manera particular para las lipasas, se han demostrado ampliamente las ventajas de la inmovilización en diferentes soportes poliméricos y la insolubilización mediante entrecruzamiento de agregados enzimáticos.

Las lipasas son enzimas de interés en química orgánica gracias a su elevada enantio- y regio-selectividad. Éstas presentan un complejo mecanismo de activación interfacial que implica cambios conformacionales entre una forma

abierta y una forma cerrada de la enzima. El control de dicho mecanismo, variando este equilibrio conformacional, podría potenciar la utilización de estas enzimas en la resolución racémica de diferentes sustratos. Esta estrategia permitiría obtener moléculas enantioméricamente puras, las cuales son de gran interés en la industria farmacológica para aplicaciones terapéuticas. La importancia de dichas moléculas radica en que uno de los isómeros puede presentar una actividad biológica de interés, mientras que el otro puede mostrar una actividad despreciable o incluso puede llegar a ser antagonista del enantiómero con la actividad deseada.

Por lo tanto, la generación de derivados lipásicos mediante diferentes estrategias de variación de las conformaciones de las enzimas (por ej. Por inmovilización sobre soportes), generará lipasas con propiedades catalíticas mejoradas para ser aplicadas en la resolución racémica de compuestos de interés en la producción de fármacos.

En este trabajo de investigación, se estudiaron las propiedades biocatalíticas de derivados de las lipasas, *Candida rugosa* (CRL) y *Alcaligenes* sp. (QL), obtenidos mediante modificación química por aminación y succinilación, utilizando estrategias de insolubilización a través de entrecruzamiento de agregados enzimáticos y la inmovilización enzimática sobre soportes epóxido activados parcialmente con diferentes grupos funcionales. Los derivados lipásicos se evaluaron en la resolución cinética de (R/S)-mandelato de metilo bajo condiciones de reacción estandarizadas.

1. Marco Teórico

Las enzimas son los catalizadores más eficientes que se conocen en los procesos biológicos, ya que catalizan reacciones acelerando el curso de la reacción a través de la disminución de la energía del complejo enzima-sustrato durante la transformación del sustrato en producto. Las enzimas pueden aumentar la velocidad de una reacción en un factor de hasta 10^{20} respecto de las reacciones no catalizadas (catalizadores no-enzimáticos suelen elevar la velocidad de reacción en factores de 10^2 o 10^4) [1]. Además de su función catalítica, las enzimas son altamente específicas, y se caracterizan por su alta regioselectividad, catalizando un cierto tipo de reacción y reaccionando con un número de sustratos estructuralmente similares (Ej. Mezclas racémicas).

1.1 Lipasas

Las lipasas son enzimas hidrolíticas que actúan de manera natural catalizando la hidrólisis de triglicéridos insolubles a ácidos grasos de cadena larga y glicerol (figura 1) [2].

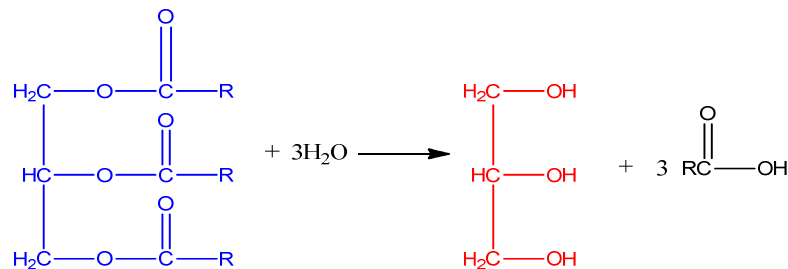


Figura 1. Hidrólisis de triglicéridos

Estudios cristalográficos han permitido determinar la estructura de las lipasas de diferentes orígenes identificándose en general que poseen una estructura tipo α/β hidrolasa [3].

De igual manera, se determinó que en la mayoría de las lipasas existe un elemento estructural móvil el cual es conocido como tapadera o “*lid*” . Éste cual consiste de dos estructuras α -hélices cortas unidas al cuerpo de la lipasa por elementos estructurales flexibles [4].

La geometría de la estructura de las lipasas es altamente conservada y pueden existir en dos formas estructurales diferentes. Una de ellas, en la cual el sitio activo se encuentra cubierto por un oligopéptido helicoidal (*lid* o tapadera), es considerada la forma cerrada, la cual es la forma inactiva de la enzima. Cuando el *lid* es desplazado, el sitio activo es expuesto al medio de reacción, generando una forma abierta de la enzima (forma activa de la lipasa) [5, 6, 7]. De esta forma, el sitio activo de la enzima es accesible al sustrato, tal como se observa en la figura 2.

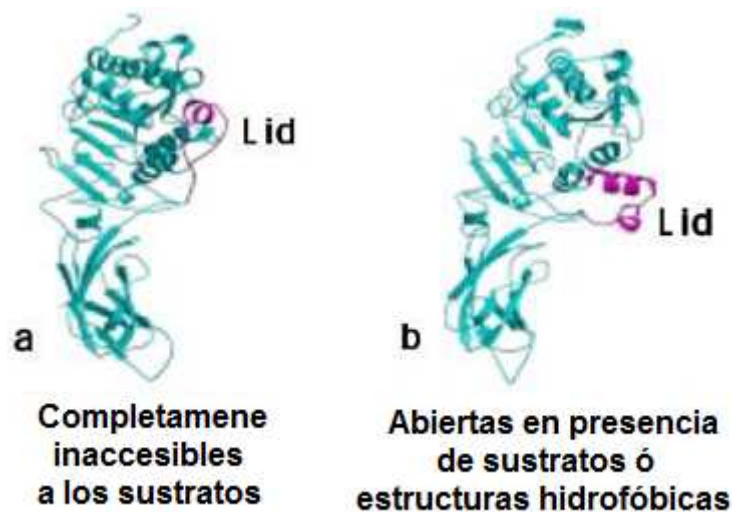


Figura 2. Conformación abierta y cerrada de la lipasa.

1.2 Activación interfacial de las lipasas

En un medio acuoso homogéneo, la lipasa existe en un equilibrio entre dos estructuras conformacionales. Sin embargo, este equilibrio se encuentra generalmente desplazado hacia la forma cerrada. Si las lipasas se ponen en contacto con una superficie hidrofóbica (por ej. Octi-agarosa, una gota de aceite, aire, etc.), se desplaza el equilibrio conformacional hacia la estructura abierta la enzima.

Sin embargo, las lipasas presentan cierta actividad catalítica en medios acuosos. Esto se debe a que las lipasas en sistemas acuosos homogéneos se encuentran en un cierto equilibrio entre la conformación cerrada y una/s conformación/es abierta/s que permiten que las lipasas presenten actividad catalítica en ausencia de interfases (**Figura 3**), con dicho equilibrio desplazado mayoritariamente hacia la conformación cerrada de las lipasas [4, 8].



Figura 3. Equilibrio de las lipasas en medio acuoso.

1.3 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 abordar desde dos conceptos, la ingeniería de proteínas, en el cual cabe resaltar la estrategia de modificación química, y la ingeniería del derivado, que permite inmovilizar enzimas de forma controlada y dirigida a través de diferentes zonas de su superficie proteica [9, 10].

1.4 Ingeniería de proteínas

Una de las formas eficientes para la modulación de las propiedades catalíticas de las enzimas, es el uso de herramientas dentro de la ingeniería de proteínas, de las cuales es posible destacar, la modificación química de aminoácidos superficiales de las proteínas. Sin embargo, la modificación química aún no ha sido estudiada a profundidad, y es por esto que se desconoce a totalidad, su aplicación para la obtención de eficaces biocatalizadores. No obstante, se conoce que la modificación química de moléculas de enzimas (modificando fundamentalmente los grupos amino y carboxilo) nos permite alterar la red iónica de la superficie de la enzima [11]. De esta manera, se modifica la conformación de las enzimas, obteniéndose un derivado enzimático que puede ser eficiente, selectivo y compatible, una vez se hayan determinado las condiciones óptimas de reacción [6].

La modificación química de las cadenas de aminoácidos permite la introducción, casi ilimitada, de una gran variedad de grupos funcionales. Es así, como se ha pretendido modificar cadenas laterales de aminoácidos presentes en la superficie (siendo estos los más accesibles), con el fin de mejorar propiedades bioquímicas de la enzima [12]. Entre los métodos de

modificación química más utilizados, se encuentran la aminación y la succinilación. Estos métodos se describen a continuación:

1.4.1 Aminación

La modificación por aminación, consiste en intercambiar grupos que poseen carga negativa por grupos con carga positiva, básicamente, los grupos terminales (carboxílicos) de los aminoácidos glutámico (Glu) y aspártico (Asp), interaccionan con diferentes reactivos para lograr introducir grupos aminos a la superficie de la enzima [13].

La reacción de aminación, involucra dos pasos: el primero, es la activación de los grupos carboxílicos, utilizando carbodiimida, (ésta es soluble en agua), y segundo, la reacción del grupo carboxilo activado con un agente nucleófilo [14], el cual puede ser un agente con un grupo amino terminal, de los cuales se destaca la etilendiamina. Esta reacción se representa en el figura 4.

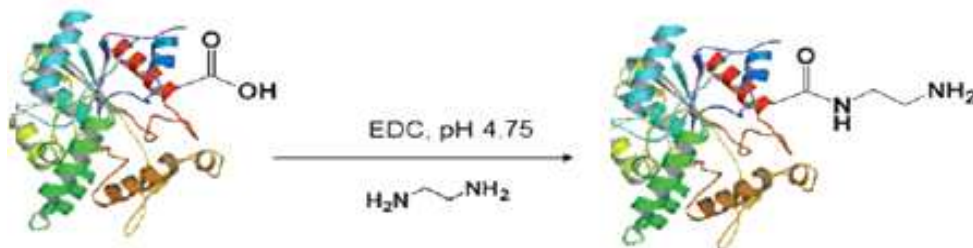


Figura 4. Reacción de aminación.

Esta reacción de aminación sucede de la siguiente manera: se inicia con la adición de la carbodiimida al medio de reacción, ésta induce la salida del hidrógeno del grupo carboxílico. Los dobles enlaces de la carbodiimida permiten la formación de un aducto, O-acil-iso-urea. El grupo carboxílico activado de este aducto, sufre el ataque nucleofílico, y es aquí cuando se

produce tanto la urea proveniente de la carbodiimida como el producto aminado de interés (Figura 5). Una reacción colateral puede darse en la reacción, el aducto O-acil-iso-urea, puede reordenarse y formar la N-acil-urea vía transferencia acil intra-molecular. Sin embargo, estudios han demostrado que esto se puede controlar y favorecer el ataque nucleofílico, adicionando el agente nucleófilo en exceso, [3, 14]. Adicionalmente, una condición importante, en la reacción de aminación es mantener el pH ácido, ya que es en este medio ácido que la carbodiimida activa el grupo carboxílico.

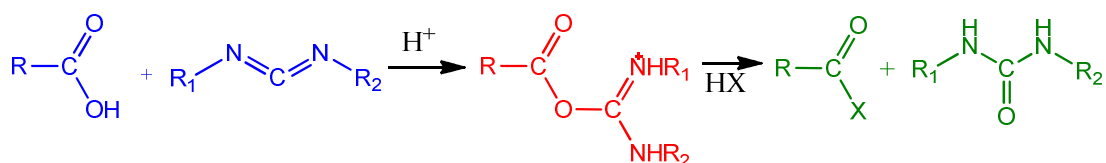


Figura 5. Pasos de la reacción; activación del grupo carboxílico, posterior ataque nucleofílico.

1.4.2 Succinilación

La modificación por succinilación consiste en intercambiar grupos que poseen carga positiva por grupos con carga negativa, es decir, grupos amino por grupos carboxilo. Los grupos amino presentes en la superficie de la enzima, pueden incluir grupos α -amino N-terminal y varios grupos ϵ -amino de la lisina. Los grupos ϵ -amino son más accesibles por lo que pueden ser modificados bajo ciertas condiciones experimentales [15]. Estos son modificados para diferentes propósitos, como por ejemplo, crear mayor cambiar la carga superficial o el punto isoeléctrico (pI) de las enzimas.

A un pH ácido, neutro o ligeramente básico (pH < 9), los grupos aminos de la superficie de la enzima, se encuentran protonados y poseen una carga positiva. El anhídrido succínico reacciona con los grupos amino para dar un

derivado enzimático modificado, el cual tendrá carga negativa a diferentes valores de pH, por ejemplo pH > 5, en los cuales los grupos carboxílicos no están protonados [11, 15]. Esta modificación química (Figura 6), en la que participan los grupos amino de las lisinas, puede alterar radicalmente la solubilidad de la enzima y su capacidad para participar en asociaciones intermoleculares [16].

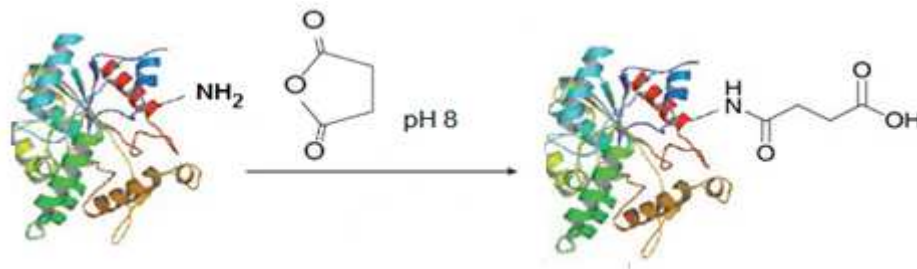


Figura 6. Reacción de succinilación.

La clave para la modificación de las enzimas, son las diferentes condiciones de reacción y el método de adición de los agentes. En este sentido, el pH y la temperatura de reacción son importantes para las modificaciones químicas que se quieran realizar [15].

1.5 Ingeniería del derivado

El desarrollo de diversas estrategias de inmovilización sobre soportes activados ha permitido la consecución de metodologías que 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 lisinas, etc). El grado de activación del soporte y las condiciones de inmovilización,

permiten controlar el grado de unión enzima-soporte y por lo tanto la rigidez de la zona inmovilizada [17].

De manera similar, se han creado estrategias de insolubilización (libre de soporte) en la cual la enzima no necesita una masa inactiva extra como transportador. Entre estas estrategias se encuentran el entrecruzamiento de enzimas en disolución (CLEs), de cristales enzimáticos (CLECs), enzima secada por aspersión (CSDEs) y una de las más destacadas, el entrecruzamiento de agregados enzimáticos (CLEAs) [18].

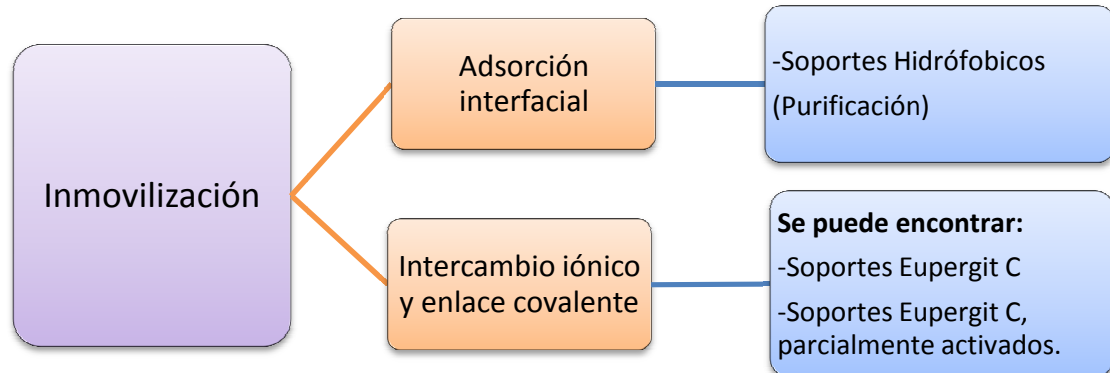
Teniendo en cuenta los grandes cambios conformacionales que implican la apertura y cierre de las lipasas, preparar derivados inmovilizados o insolubilizados de lipasas, podría también alterar en gran medida sus propiedades catalíticas. De esta forma, diferentes derivados de una misma lipasa tendrían propiedades catalíticas (especificidad, selectividad, enantioselectividad, etc) muy diferentes [6, 19].

1.5.1 Inmovilización de enzimas

Las enzimas pueden ser inmovilizadas sobre un soporte, a través de algún tipo de interacción entre los residuos aminoacídicos de la molécula proteica y el soporte. En consecuencia, pueden perder parte de su actividad catalítica y la enantioselectividad del catalizador al comprometer el sitio activo (o residuos ubicados cerca del sitio activo) por la unión al soporte. Sin embargo, con la inmovilización se tiene grandes ventajas, de las cuales se resaltan dos: el aumento de la estabilidad de la enzima y la reutilización de los derivados inmovilizados [9, 20].

En general, dentro de los métodos de inmovilización de lipasas se pueden encontrar dos grandes categorías como los son la inmovilización sobre

soportes hidrofóbicos y la inmovilización sobre soportes epóxido, los cuales pueden activarse para favorecer una unión multi-puntual con el soporte. Estos se resumen en el esquema 1.



Esquema 1. Métodos de inmovilización de lipasas

1.5.1.1 Inmovilización sobre soporte hidrofóbico

Las características estructurales de las lipasas las hace altamente afines por interface hidrofóbicas, facilitando el desarrollo de métodos eficientes de inmovilización [8].

La conformación abierta de las lipasas muestra al medio un gran bolsillo hidrofóbico que por sus características tiene una gran afinidad por cualquier superficie hidrofóbica. Se ha descrito que las lipasas se adsorben a diferentes estructuras hidrofóbicas, tales como gotas de grasa y soportes hidrofóbicos (Octil-agarosa, glioxil-agarosa). La adsorción sobre estos soportes hidrofóbicos, se va favorecida por una baja fuerza iónica, facilitando el desplazamiento del *lid* y generando la conformación abierta de la enzima [8, 9].

Adicionalmente, la inmovilización sobre estructuras hidrofóbicas a baja fuerza iónica, ha provisto de un método eficiente de purificación de lipasas, ya que bajo esta condición son la únicas proteínas que se adsorben sobre este tipo de soportes [8]

1.5.1.2 Inmovilización sobre soportes epoxiacrílicos

Entre los soportes con grupos epóxidos se encuentran los soportes epoxiacrílicos (por ej. Eupergit/Sepabeads comerciales), que poseen una mayor o menor hidrofobicidad. Presentan poros con grandes superficies recubiertas de grupos epóxido, los cuales, en principio, pueden reaccionar con varios grupos funcionales de la proteína dependiendo de las condiciones, dando directamente uniones muy estables, tales como: grupos amino (amino secundario), tioles (tio-éteres), hidróxilo (éteres). Sin embargo, los grupos epóxidos, en condiciones suaves (pH 7, baja fuerza iónica) presentan una reactividad muy baja con las enzimas solubles [6, 17].

De esta manera, se ha propuesto que el proceso de inmovilización de enzimas a soportes con grupos epóxido se produce siguiendo un mecanismo en dos etapas (Figura 7).

1°-La adsorción física de la enzima sobre el soporte, lo cual permite acercamiento de la enzima al soporte (tradicionalmente una adsorción hidrofóbica).

2°-La unión covalente entre la enzima adsorbida y los grupos epóxido del soporte.

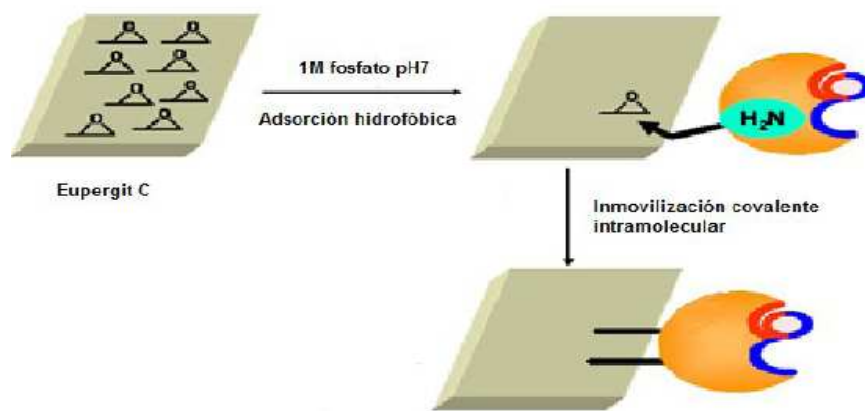


Figura 7. Inmovilización sobre soportes epóxido [9].

De acuerdo con el mecanismo de inmovilización sobre soportes epóxido en dos etapas y teniendo en cuenta las condiciones ambientales (suaves) que se deben utilizar para la inmovilización, se han desarrollado recientemente el diseño de soportes epóxido multifuncionales que cumplan con este objetivo [17]. Se ha propuesto que en general los soportes epóxido multifuncionales deben contener dos tipos de grupos funcionales: (i) Primero, deben ser grupos que promuevan la adsorción física de las proteínas (intercambio iónico, etc.) y (ii) segundo, grupos que logren inmovilizar covalentemente la enzima (grupos epóxido)

La modificación de un pequeño porcentaje de grupos epóxido del soporte con distintos compuestos como iminodiacético (IDA), etilendiamina (EDA), quelato de cobre (IDA-Cu) puede provocar diferente tipo de adsorción de las moléculas de proteína sobre el soporte [17].

Este tipo de soportes epóxido multifuncionales, adsorberán las proteínas a través de diferentes zonas dependiendo del compuesto introducido en el soporte, lo cual marcará la orientación final de la enzima inmovilizada [21]. Es así, que para soportes epóxido parcialmente modificados con etilendiamina (Soporte epóxido-etilendiamina EC-EDA), la proteína se adsorberá sobre este soporte a través de las zonas de su superficie más ricas en cargas negativas [19]. Esta modificación parcial de los soportes epóxido, proporciona ventajas que se ven reflejadas en el incremento de la actividad y estabilidad de la enzimas inmovilizadas sobre dichos sistemas [20].

1.5.2 Insolubilización por entrecruzamiento de agregados enzimáticos (CLEAs)

Se ha desarrollado recientemente una nueva forma de insolubilización 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 (figura 8).

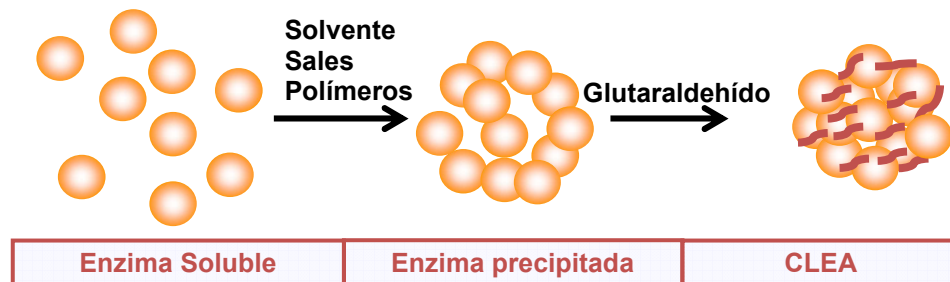


Figura 8. Etapas de entrecruzamiento de agregados enzimáticos

La primera etapa de precipitación es comúnmente utilizada como método de purificación de proteínas [22]. Estos agregados físicos son estructuras supramoleculares unidas por enlaces no covalentes, las cuales pueden ser re-disueltas 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 apropiado.

Investigaciones recientes muestran que para concentraciones altas de precipitante los resultados obtenidos son muy buenos, lográndose en algunos casos 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, concentraciones menores del 70% v/v de agente precipitante, mostraron inactivaciones parciales debido a que la precipitación es incompleta.

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 agregación [22].

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 son nucleofílicos los grupos terminales de muchos aminoácidos presentes en la superficie de la enzima.

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 ha mostrado estabilidad excepcional para pH y temperaturas extremas. Estas bases de Schiff simples, con ambos extremos de glutaraldehído pueden ser utilizadas como un mecanismo para el entrecruzamiento de proteínas [18, 22].

1.6 Resolución cinética catalizada por lipasas

Uno de los métodos usados en la resolución de racematos es la resolución cinética. 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 otro [19].

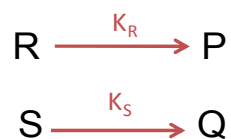


Figura 9. Resolución Cinética Catalítica

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 esta razón, el tiempo óptimo para terminar la resolución es cuando se ha alcanzado el equilibrio del reactante rápido.

1.6.1 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:

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

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.) [24]. El valor de E está definido como la relación de las constantes específicas de velocidad para los dos enantiómeros de la mezcla racémica:

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

Donde k_{cat} es la constante de velocidad y K_M es la constante de Michaelis-Menten. La siguiente ecuación está en términos del exceso enantiomérico del producto (ee_p), el enantiómero remanente (ee_s) y la conversión (c). 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 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:

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

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.

1.6.2 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 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. La cromatografía líquida de alta eficiencia (**HPLC**) representa una de las herramientas más empleadas en los laboratorios analíticos, gracias a que permite el análisis de una amplia variedad de moléculas, particularmente, de altos pesos moleculares y termolábiles, que no se pueden separar por cromatografía de gases. La técnica de HPLC ha permitido la separación e identificación de diversas moléculas en distintas matrices, empleando principalmente la cromatografía en fase reversa, es decir, cuando la fase estacionaria es de menor polaridad

significativa que la fase móvil; así la fase estacionaria retendrá con mayor fuerza los analitos menos polares. En cuanto a la fase móvil, se han utilizado mezclas de agua y modificadores orgánicos como acetonitrilo, metanol, tetrahidrofurano, entre otros. Estos solventes pueden ser utilizados cada uno por aparte o como mezclas, dando la opción de utilizar una fase móvil de composición constante (elución isocrática) o variable, con el fin de dar a la fase móvil diferentes grados de polaridad (elución en gradiente), durante el tiempo en el que los analitos pasan por la columna.

Para la detección de los analitos, se utilizan distintos detectores, uno de estos es el arreglo de diodos ultravioleta-visible (DAD UV-VIS), porque ha mostrado buena sensibilidad y amplio rango dinámico lineal, y a que además permite trabajar en el rango aproximado entre 190 -1100 nm.

2. Materiales y métodos

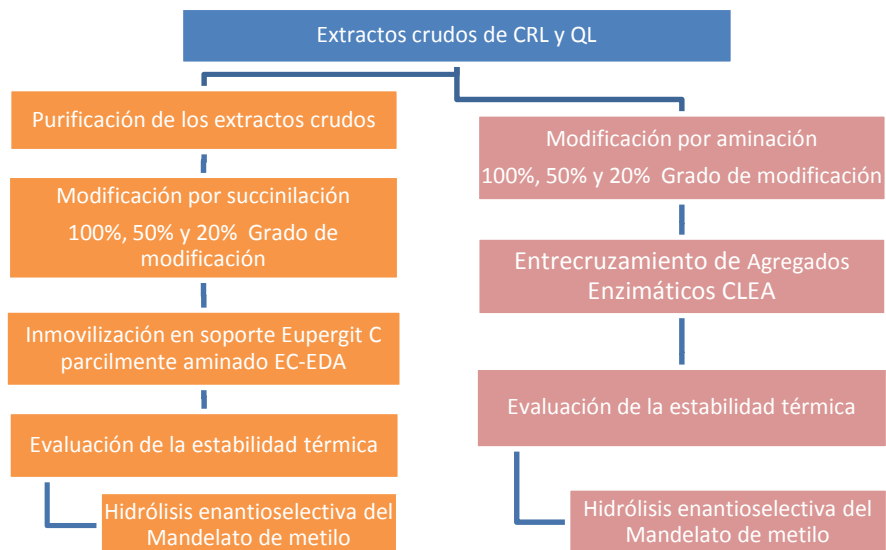
2.1 Materiales

La lipasa de *Candida rugosa* (CRL) y la lipasa QL de *Alcaligenes sp.* se obtuvieron de Sigma Chemical Co. Los marcadores de peso molecular son de Fermentax. El triton X-100, el *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NPB), (R,S)-mandelato de metilo, (R)-mandelato de metilo, (S)- mandelato de metilo, etilendiamina (EDA), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y anhídrido succínico, se obtuvieron también de Sigma.

Las lipasas CRL y QL, fueron preparadas en una solución de fosfato de potasio 5mM y 25mM respectivamente, de pH 7.

2.2 Metodología experimental

Se presenta el diagrama de flujo que se siguió para la consecución del objetivo principal del proyecto.



Esquema 2. Diagrama de flujo para la metodología.

2.2.1 Purificación de lipasas CRL y QL por activación interfacial

Las lipasas CRL y QL fueron purificadas por cromatografía de adsorción interfacial de acuerdo con la metodología propuesta en la literatura [8].

Adsorción interfacial de lipasas en geles de Octil-Agarosa

La purificación se realizó a muy baja fuerza iónica (5 mM) y pH 7, manteniendo una relación 1:5 y 1:10 de soporte y solución enzimática para CRL y QL, respectivamente. Periódicamente, se obtuvieron muestras de sobrenadante y suspensión para ser analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) [26], y analizadas por ensayo de actividad con el p-NPB, como se describe más adelante en la sección 2.3.1.

Desorción de la enzima del soporte Octil-Agarosa

Las enzimas CRL y QL adsorbidas sobre el soporte octil-agarosa fueron incubadas en una solución de buffer fosfato 5mM y pH7, conteniendo el surfactante no iónico Triton X-100 al 0.5 y 0.3%v/v para CRL y QL, respectivamente. Periódicamente, se determinaron las actividades del sobrenadante y la suspensión tal como se describe en la sección 2.3.1.

2.2.2 Modificación química de CRL y QL

2.2.2.1 Modificación por succinilación

A 10mL de solución lipásica previamente purificada, se agregaron diferentes cantidades de anhídrido succínico para lograr diferentes porcentajes de modificación: 200mg de anhídrido succínico para 100% de modificación, 100mg para 50% de modificación y 25mg para 20% de modificación en constante agitación (200 rpm) y temperatura de 25°C, durante 1.5h; se

añadió solución de hidróxido de sodio 0.1M para ajustar el pH en un valor de 8. Los derivados succinilados (CRL-S y QL-S) fueron lavados y filtrados con suficiente agua destilada. Se determinó la actividad enzimática al finalizar la reacción, como se describe en la sección 2.3.1.

Las lipasas modificadas por succinilación fueron posteriormente inmovilizadas en Eupergit C aminado, como se describirá en el numeral 2.2.4.

2.2.2.2 Modificación por aminación

Reacción de aminación

Se tomaron 10 mL de enzima soluble y se añadieron 12.5 mL de solución 1M de EDA a pH 4.7, bajo agitación y en baño frío. Se agregaron diferentes cantidades de EDC para lograr diferentes concentraciones finales de EDC: 0.01M para un 100% de modificación, 0.005M para un 50% de modificación y 0.002M para un 20% de modificación. Después de 1.5h en agitación (200 rpm), los derivados obtenidos (CRL-A y QL-A) fueron lavados y almacenados a 4°C. Se determinó su actividad al finalizar la reacción, como se describe en la sección 2.3.1.

Las lipasas modificadas por aminación, fueron posteriormente insolubilizadas por entrecruzamiento de agregados enzimáticos (CLEA).

2.2.3 Inmovilización de lipasas modificadas (CRL-S y QL-S) sobre soporte EC-EDA

Las lipasas previamente succiniladas fueron inmovilizadas en soportes Eupergit C aminados (EC-EDA).

Para la inmovilización se adicionó 5 mL de la enzima succinilada sobre 0,5 g de soporte EC-EDA, con agitación suave durante 29h. Periódicamente, se

evaluó el proceso de inmovilización sobre el soporte midiendo la actividad del sobrenadante y la suspensión tal como se describe en la sección 2.3.1.

2.2.4 Insolubilización de lipasas modificadas (CRL-A y QL-A) por entrecruzamiento de agregados enzimáticos (CLEAs)

Se transfirió un volumen de 0.5 ml de CRL-A y QL-A a tubos de ensayo fondo plano en un baño frío, bajo agitación suave.

A los tubos de ensayo conteniendo a CRL-A y QL-A respectivamente, se adicionó 3.0 ml de t-butanol como agente precipitante (50, 70, 90 % v/v), y se dejó bajo agitación durante al menos 30min. A los agregados de CRL-A y QL-A formados, se le adicionó glutaraldehído como agente entrecruzante (0,5, 1 y 2 %V/V).

A partir de la mezcla acuosa que contenía agregados entrecruzados CLEA-CRL-A y CLEA-QL-A, por separado, y derivados que no reaccionan con el glutaraldehído, se extrajo un volumen de 50 μ L y se diluyó en una relación de (1:20) con buffer fosfato 25 mM de pH 7, determinando su actividad catalítica tal como se describe en la sección 2.3.1. [27].

Posteriormente, se centrifugó la mezcla acuosa que contenía los agregados entrecruzados insolubles y la enzima libre. Se determinó la actividad catalítica de los derivados obtenidos como se describe en la sección 2.3.1.

La figura 10, describe el proceso general de síntesis de agregados entrecruzados de CRL-A y QL-A.

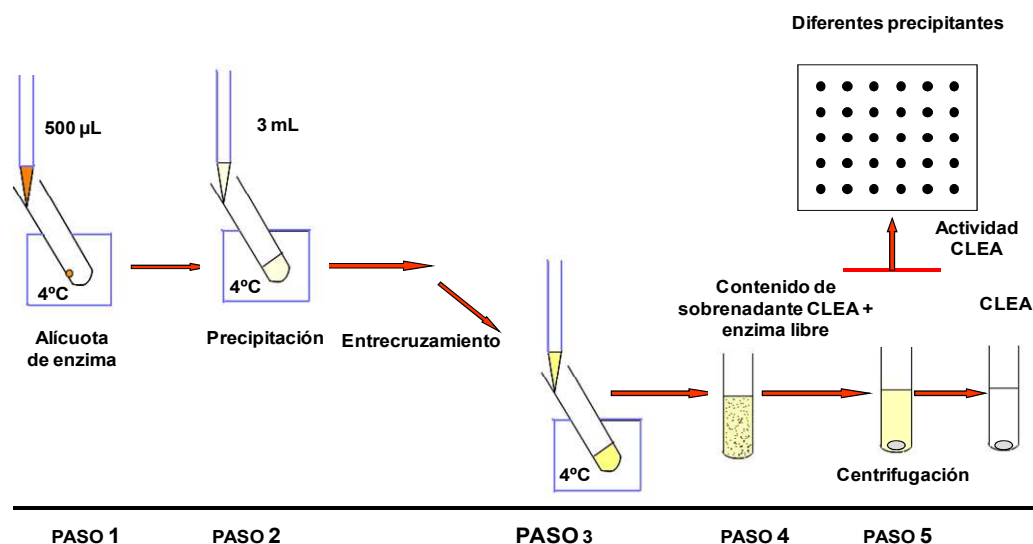


Figura 10. Procedimiento para la elaboración de CLEAs [27].

La actividad catalítica de los agregados entrecruzados de CRL y QL aminados, se determinó como la diferencia entre la actividad catalítica del paso 4 y la actividad del paso 5.

2.2.5 Evaluación de la estabilidad térmica de los derivados inmovilizados sobre soporte (EC-EDA) y derivados entrecruzados (CLEAs)

Los derivados enzimáticos EDA-CRL-S, EC-EDA-QL-S, CLEA-CRL-A y CLEA-QL-A, (200 µL de suspensión de derivados), se incubaron a diferentes temperaturas (70, 80 y 90 °C) en 1 ml de solución buffer de fosfato 25 mM de pH 7. Periódicamente (0, 5, 15, 30, 60 min), se tomaron muestras del medio de incubación a las cuales se les determinó su actividad enzimática como se describe en la sección 2.3.1. [19, 27]

2.2.6 Hidrólisis del mandelato de metilo catalizada por los derivados modificados de CRL y QL.

La enantioselectividad del mandelato de metilo fue estudiada llevando a cabo la hidrólisis para cada uno de los enantiómeros puros del mandelato de metilo [(R)- y (S)-] utilizando cada uno de los derivados obtenidos bajo las mismas condiciones de reacción.

El R-mandelato de metilo y el S-mandelato de metilo, fueron preparados en una solución buffer fosfato de potasio 25 mM a pH 7 y 25°C. Para llevar a cabo la reacción, se añadieron 10 mg de los derivados obtenidos a 10 mL de la solución de racemato 1mM, en agitación a 200rpm.

Periódicamente, el progreso de la reacción fue monitoreado extrayendo a diferentes tiempos alícuotas del medio de reacción y analizando el producto (ácido mandélico) formado y el sustrato consumido como se describe en la sección 2.3.4 [19]

2.3 Metodología analítica

2.3.1 Determinación de la actividad lipásica utilizando p-Nitrofenilbutirato (p-NPB)

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 pNPB 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 añadió a 2,5 mL del sustrato. Una unidad internacional de actividad de pNPB se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μmol de pNPB por minuto (U) bajo las condiciones descritas anteriormente. El coeficiente extinción molar usado para el producto de reacción fue de $3100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.3.2 Determinación de la concentración de proteína

La concentración proteica de la preparación comercial de las lipasas CRL y QL, se determinó utilizando el método de Bradford [28]. La curva de calibración se obtuvo con seroalbúmina bovina (BSA) para determinar las concentraciones de proteína en un rango comprendido entre 0,1 y 1 mg/mL (Ver anexo). Así CRL contenía 0,5 mg/mL y QL 0,55 mg/mL.

2.3.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS PAGE

Las enzimas purificadas fueron confirmadas 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) [26].

2.3.4 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. La fase móvil fue una mezcla isocrática de acetonitrilo y buffer fosfato de amonio 10 mM, pH 3 en proporción 35:65v/v. El flujo utilizado fue 1 mL/min y la detección UV fue desarrollada a 225 nm. Los tiempos de

retención fueron los siguientes: (R/S)-ácido mandélico ($t_R = 3.402$ min) y (R,S)-Mandelato de metilo ($t_R = 5.575$ min) [19].

3. Resultados y Discusión

3.1 Purificación del CRL y QL, por cromatografía de adsorción interfacial.

Las lipasas CRL y QL fueron purificadas a partir de los crudos enzimáticos comerciales, con el fin de eliminar las posibles esterasas contaminantes, así como estructuras macromoleculares (dímeros u oligómeros) de las lipasas, [8, 9]. Para esto se realizó el método de purificación reportado en la literatura, la adsorción interfacial sobre geles de octil-agarosa a baja fuerza iónica y pH 7 [8].

La inmovilización de CRL sobre octil-agarosa transcurrió de forma rápida (1 hora) utilizando una relación de 1:5 de volumen de octil agarosa- volumen de enzima. Durante el proceso de inmovilización, no se observó el efecto de hiperactivación característico de las lipasas, tal vez debido a restricciones difusionales de la carga enzimática añadida a los geles de octil-agarosa [19, 29]. En las condiciones experimentales usadas durante la inmovilización se adsorbió el 97% de la enzima sobre el soporte. El 3% restante de actividad podría atribuirse a esterasas no lipásicas presentes en el extracto de CRL que no se adsorben a baja fuerza iónica sobre el soporte de octil-agarosa. En estos derivados se obtuvo una carga enzimática de 3 mg de CRL pura/g octil-agarosa. En la figura 11, se muestra la cinética de inmovilización de la CRL sobre el soporte hidrofóbico de octil-agarosa.

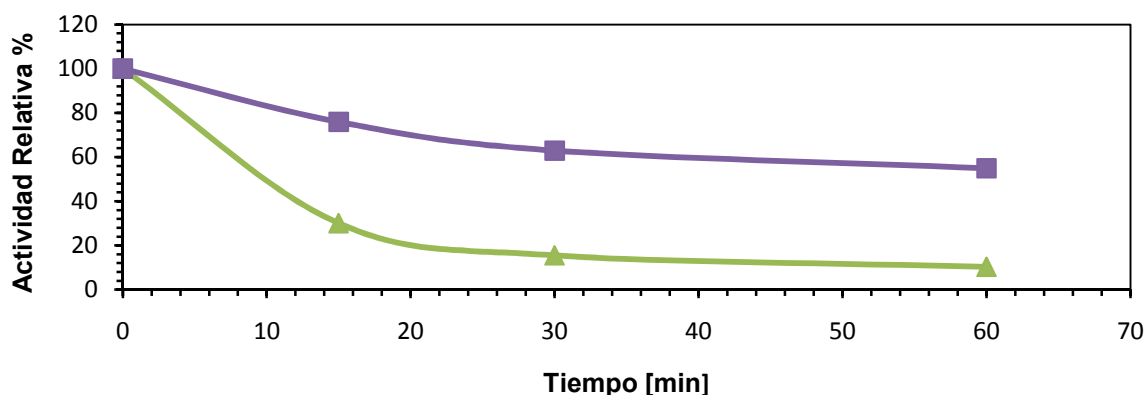


Figura 11. Cinética de la inmovilización de CRL en Octil-Agarosa. (▲) Sobrenadante (■) Suspensión. El 100% de la actividad relativa de CRL corresponde a 126.9 U/mg .

Para el caso de la adsorción de QL sobre los geles de octil agarosa, el proceso de inmovilización transcurrió de forma rápida, de manera similar a la observada para la lipasa de CRL. En la adsorción de QL sobre los geles de octil-agarosa, se observó el efecto de activación interfacial característico de las lipasas debido a la presencia de superficies hidrofóbicas, que ocasionan el desplazamiento del *lid*, originando mayoritariamente su conformación abierta [5, 8, 9].

En las condiciones experimentales usadas durante la inmovilización se adsorbió cerca del 99% de las lipasas QL sobre el soporte. El 1% restante de actividad puede atribuirse a esterases o lipasas presentes en el extracto de QL que no pueden ser adsorbidas por el soporte octil agarosa [8]. Se obtuvo una carga enzimática de 1.5 mg de QL pura/g octil-agarosa. En la figura 12, se muestra la cinética de inmovilización de la QL sobre el soporte hidrofóbico de octil-agarosa.

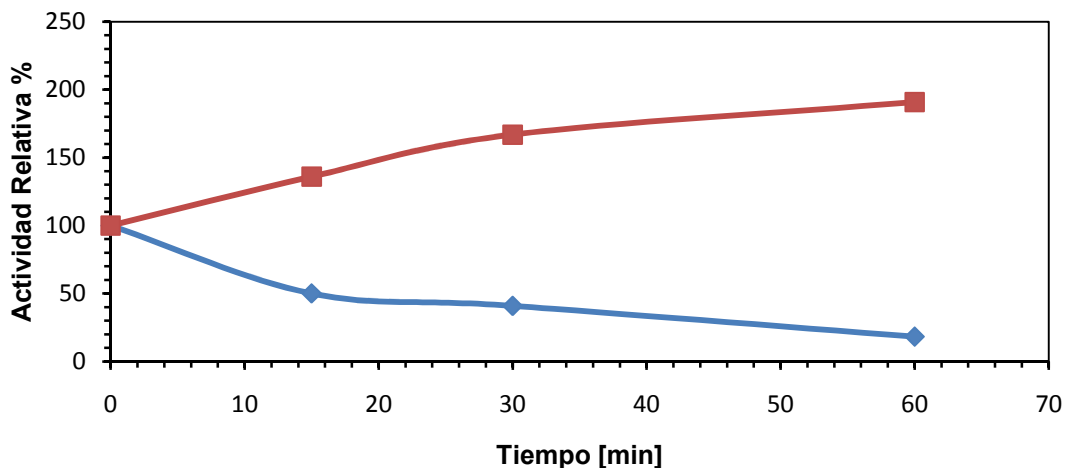


Figura 12. Cinética de la inmovilización de QL en Octil-Agarosa. (◆)Sobrenadante (■)Suspensión. El 100% de la actividad relativa de QL corresponde a 19.6 U/mg.

Una vez inmovilizadas sobre el soporte, la enzimas CRL y QL fueron desorbidas completamente mediante la adición de Triton X-100 al 0.5 y 0.3% v/v. Estas condiciones de desorción han sido reportadas y estandarizadas en la literatura [8, 19, 30].

En la figura 13 se muestran los perfiles electroforéticos obtenidos por SDS-PAGE de las lipasas CRL y QL purificadas por cromatografía de adsorción interfacial en geles de octil-agarosa. En ellos se puede observar que tanto la lipasa CRL, como la QL, se adsorbieron de manera específica sobre el soporte, presentándose una banda característica de 60 kDa para la CRL y 33 kDa para QL, que corresponden al PM en sus formas monoméricas [30, 31].

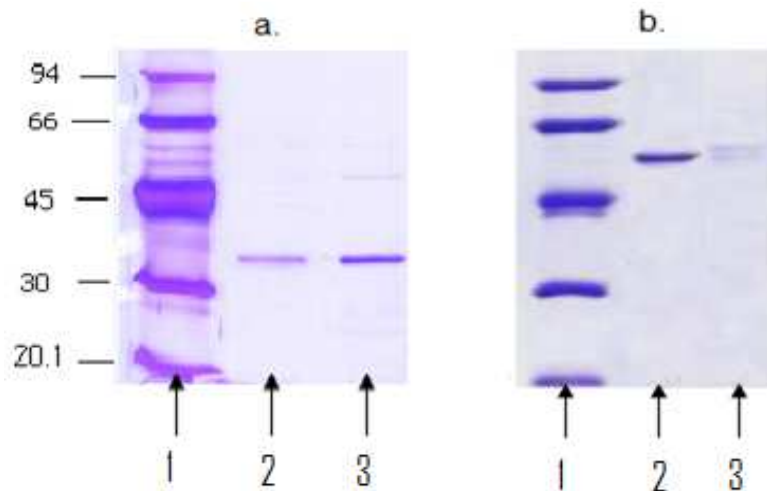


Figura 13. Electroforesis SDS-PAGE de las preparaciones de la lipasa de CRL y QL a) Carril 1. Marcadores de bajo peso molecular. Carril 2. Preparación enzimática de QL Carril 3. QL adsorbida sobre octil-agarosa. b) Carril 1. Marcadores de bajo peso molecular. Carril 2. Preparación enzimática de CRL. Carril 3. CRL adsorbida sobre octil-agarosa.

3.2 Modificación química de las enzimas CRL y QL purificadas a través de la reacción de Succinilación.

Las lipasas purificadas de CRL y QL fueron modificadas a través de reacciones de succinilación. Esta reacción, modifica los grupos α -amino de las lisinas presentes en la superficie de la enzima [15]. Una modificación de este tipo, conlleva a una alteración a nivel estructural de la enzima producto del cambio en el balance de fuerzas e interacciones implicadas entre sus aminoácidos y el microambiente acuoso que la rodea [11, 15].

Los resultados obtenidos al modificar las enzimas CRL y QL (Tabla1) muestran como el incremento en el grado de modificación de los residuos de lisina superficiales de las enzimas CRL y QL ocasionan una disminución en la expresión de sus actividades catalíticas con respecto a los extractos nativos no modificados. Esta disminución se debe posiblemente a cambios conformacionales por la introducción de nuevos grupos que alteran la

naturaleza iónica de la superficie de las enzimas [11], generando conformaciones de la enzima donde el sitio activo se encuentra menos accesible para el sustrato en el medio de reacción [15]. La Tabla 1 muestra las actividades enzimáticas expresadas por las lipasas de CRL y QL succiniladas a tres distintos grados de modificación.

Tabla 1. Actividades de los extractos enzimáticos succinilados. La actividad relativa se define como la actividad expresada de la enzima modificada comparada con la enzima purificada. El 100% de actividad relativa corresponde a: 337.2 U/mg y 40.21 U/mg, para CRL y QL respectivamente.

Derivados enzimáticos	Actividad Relativa (%)	
	CRL	QL
Enzima Purificada	100	100
E. Succinilada 100%	25.3	27.2
E. Succinilada 50%	23.9	24.1
E. Succinilada 20%	23.1	17.5

En la tabla 1 se puede observar como para una modificación parcial de tan solo el 20% la CRL-S pierde cerca del 75% su actividad inicial, mientras que la QL-S pierde hasta un 82%. Además, se observó que el incremento del grado de modificación hasta una 100% permite obtener derivados que retienen una mayor actividad enzimática. Resultados similares han sido reportados por diferentes autores donde evaluaron el efecto de la modificación por succinilación en la actividad catalítica, mostrando una disminución proporcional al grado de modificación [11, 32].

Una vez determinado que los extractos enzimáticos de CRL y QL modificados al 100% retenían un mayor porcentaje de su actividad inicial, se seleccionó este grado de modificación para el estudio de su inmovilización sobre el soporte epóxido EC, activado parcialmente con grupos amino.

3.3 Inmovilización de las enzimas CRL y QL succiniladas, sobre soportes Eupergit C aminados (EC-EDA)

Una vez realizada la modificación química a través de la reacción de succinilación de las lipasas CRL y QL, se evaluó el efecto de ésta sobre la inmovilización covalente en el soporte epóxido EC activado parcialmente con grupos amino EC-EDA (20% de activación de la densidad total de grupos epóxido).

Este tipo de soporte fue seleccionado debido a que posee gran estabilidad a pH neutro, puede almacenarse por largos periodos de tiempo [19] y permite obtener mayor estabilidad en la inmovilización enzima-soporte promovida por las diferentes interacciones. Además, el grado de activación del soporte EC-EDA puede conferir diferente orientación de la enzima sobre el soporte. En este sentido, en el grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología se ha estandarizado ampliamente la activación de este soporte heterofuncional para su uso en inmovilizaciones de lipasas de origen microbiano [8, 20].

Para el caso particular de las lipasas, este tipo de inmovilización puede producir una dramática alteración de su rigidez y orientación sobre el soporte, reduciendo completamente la movilidad de los grupos funcionales de la proteína lo que puede implicar un cambio en las propiedades biocatalíticas de las lipasas [17]. Por tal razón, se evaluó el efecto que puede causar la modificación en la densidad de grupos carboxilos en la superficie de la enzima, sobre la inmovilización en el soporte EC-EDA. Para tal efecto, se inmovilizó los extractos solubles modificados por succinilación de CRL y QL. En las figuras 14 y 15, se muestra los cursos de inmovilización de las lipasas CRL y QL modificadas.

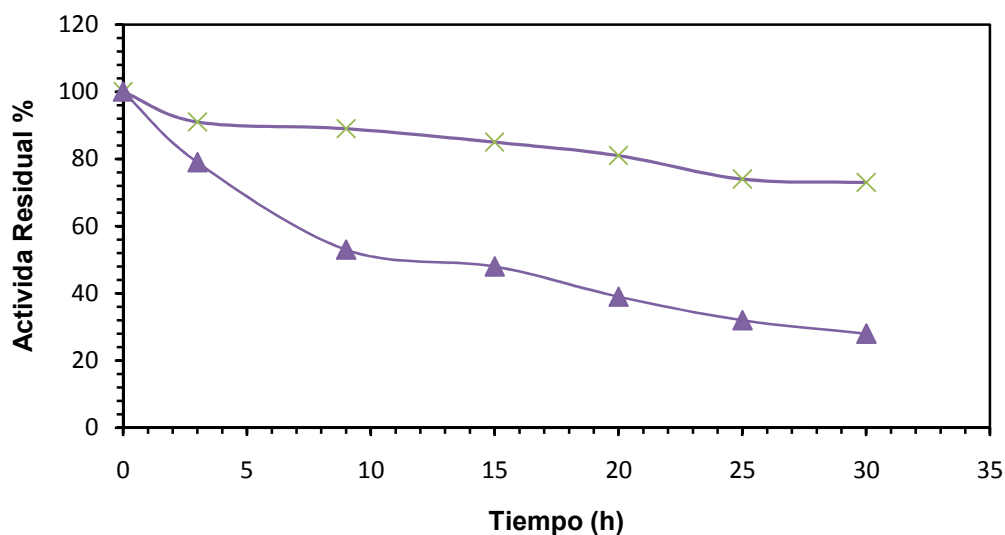


Figura 14. Cursos de inmovilización de CRL succinilada sobre EC-EDA. (×) Suspensión; (▲) Sobrenadante. El 100% de actividad corresponden a la actividad de CRL succinilada 85.35 U/mg. Los experimentos se realizaron a pH 7 y 25 °C.

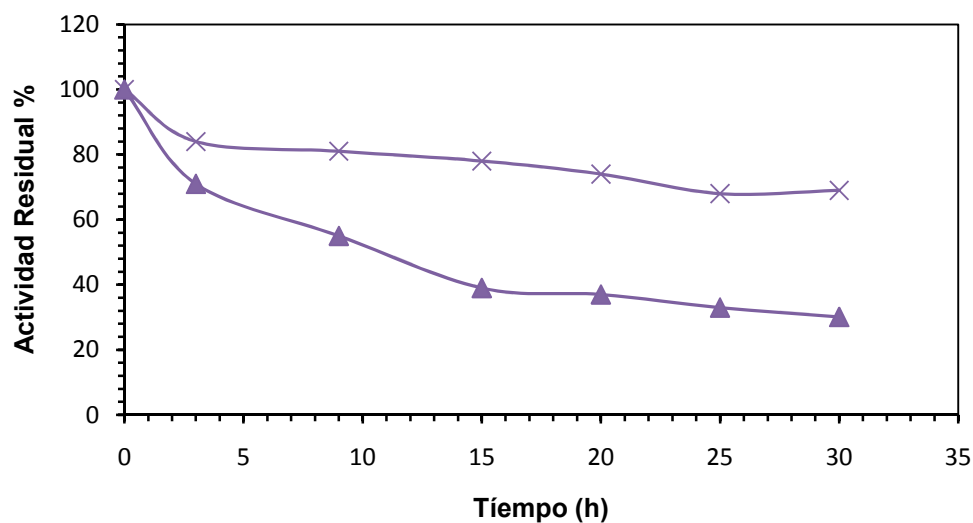


Figura 15. Cursos de Inmovilización de QL succinilada sobre soporte EC-EDA. (×) Suspensión; (▲) Sobrenadante. El 100% de actividad corresponden a la actividad de QL succinilada 10.95 U/mg. Los experimentos se realizaron a pH 7 y 25 °C.

En las figuras 14 y 15, se observa que los valores de actividad de los sobrenadantes disminuyen durante el transcurso de la inmovilización, lo cual significa que las enzimas CRL-S y QL-S están siendo retenidas por el soporte, lo cual contrasta con la actividad expresada por la suspensión, en la cual se encuentra, la enzima inmovilizada y no inmovilizada.

En la tabla 2, se encuentran los porcentajes de inmovilización y los porcentajes de actividad expresada una vez ha transcurrido el tiempo de inmovilización para CRL y QL purificadas, y CRL y QL succiniladas, inmovilizadas en EC-EDA.

Tabla 2. Rendimiento de Inmovilización y Actividades expresadas para cada uno de los derivados evaluados.

	Rendimiento de Inmovilización (%)	Actividad Expresada (%)
EC-EDA-CRL-Purif	59.3	85.8
EC-EDA-CRL-S	73.8	54.8
EC-EDA-QL-Purif	47.7	75.4
EC-EDA-QL-S	69.3	46.9

En este sentido para el caso de CRL y QL sin modificación se logró inmovilizar menos unidades catalíticas por gramo de soporte, mientras que las enzimas que han sido succiniladas presentaron mayor inmovilización sobre el soporte EC-EDA. Era de esperar este resultado, ya que el soporte utilizado, EC-EDA, se encuentra activado con grupos amino que favorecen la inmovilización de las enzimas succiniladas las cuales poseen mayor número de grupos carboxilos. Los resultados de actividad expresada por cada uno de los derivados, posiblemente se deban a la orientación adquirida por la enzima inmovilizada, para lo cual es posible que el sustrato acceda más

fácilmente al sitio activo de las enzimas inmovilizadas que no fueron modificadas [9, 17, 36].

3.4 Modificación química de las enzimas CRL y QL, a través de la reacción de Aminación.

Se realizó la modificación química a través de reacciones de aminación para las enzimas CRL y QL. Esta reacción modifica grupos carboxilo de los residuos ácido glutámico y ácido aspártico presentes en la superficie de la enzima, introduciendo grupos amino [14]. La reacción de aminación se llevó a cabo a tres diferentes grados de modificación y se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 3.

Las actividades que exhiben los extractos obtenidos por aminación, muestran como el incremento del grado de modificación de los residuos ácido glutámico y ácido aspártico de las enzimas CRL y QL, ocasiona una disminución comparada con la actividad que presentan las enzimas en su estado soluble. Se observa que para un grado de modificación del 100% se retiene un mayor porcentaje de la actividad inicial, exhibiendo una actividad de 68.7% y 35.7% para CRL y QL respectivamente. Al modificar la enzima a un 20% las enzimas exhiben tan solo 47.8% y 30.6% de la actividad inicial. Esta disminución de la actividad puede ser atribuida a los cambios estructurales que sufre la enzima después de la modificación química. Al introducir grupos con carga positiva, cambian las interacciones iónicas, y por lo tanto, puede alterar la conformación de la enzima, ocultando o dejando inaccesible el sitio activo. Similares resultados fueron obtenidos por otros autores [10, 11], donde distintas enzimas fueron sometidas a la reacción de aminación y se obtuvieron derivados con menor actividad catalítica. La Tabla 3 muestra las actividades enzimáticas expresadas por las lipasas de CRL y

QL modificadas a tres distintos grados de modificación a través de la reacción de aminación.

Tabla 3. Actividades de los extractos enzimáticos aminados. La actividad relativa se define como la actividad expresada de la enzima modificada comparada con la enzima soluble. El 100% de actividad relativa corresponde a: 126.9 U/mg y 19.6 U/mg, para CRL y QL respectivamente.

Derivados enzimáticos	Actividad Relativa (%)	
	CRL	QL
Enzima Soluble	100	100
E. Aminada 100%	68.72	35.75
E. Aminada 50%	59.63	32.69
E. Aminada 20%	47.84	30.65

En este caso, se debe resaltar la importancia de las condiciones de reacción para garantizar que la enzima no sufra desnaturalización, por el cambio drástico de las condiciones del medio. Además, es importante mantener un medio ácido durante el transcurso de la reacción, ya que el agente activador (carbodiimida) necesita de este medio para poder formar el aducto (el grupo carboxilo terminal activado), el cual reacciona con la etilendiamina [14] y de este modo, introducir el grupo amino.

Manteniendo estas condiciones es posible obtener derivados enzimáticos donde se ha modulado las propiedades catalíticas de la enzima, como lo es la actividad, a través de los cambios en la red iónica en la superficie de la misma [37, 39].

3.5 Insolubilización de lipasas modificadas (CRL-A y QL-A) por entrecruzamiento de agregados enzimáticos (CLEAs)

3.5.1 CLEA de CRL-A

Una vez obtenidos los extractos enzimáticos modificados por aminación, se evaluó el efecto de la modificación en la insolubilización por entrecruzamiento de agregados enzimáticos, CLEA. Esta estrategia permite el entrecruzamiento efectivo entre un agente bifuncional y los grupos amino superficiales de la enzima. Por tanto, a través de esta estrategia se evaluó el efecto ocasionado por el incremento en la densidad de grupos amino en las lipasas CRL y QL en el proceso de insolubilización.

En el proceso de obtención de CLEAs, tanto la agregación de la enzima a través de la precipitación por un solvente orgánico, como la concentración del agente entrecruzante, influyen de manera significativa sobre las propiedades catalíticas que exhibe el CLEA obtenido [18, 38]. Por esta razón, es importante la selección adecuada del tipo de solvente a utilizar y su concentración, así como la determinación de la concentración de agente entrecruzante que no ocasione la desnaturalización de la enzima.

Para la elaboración de los CLEAs de CRL-A y QL-A se realizó un “*screening*” con sulfato de amonio, etanol y *tert*-butanol, como agentes precipitantes. Los resultados obtenidos mostraron que el *t*-butanol no ocasionó un efecto desnaturalizante sobre las enzimas aminadas, como si se presentó con etanol y el sulfato de amonio. Por esta razón, se seleccionó el *t*-butanol como agente precipitante. Como agente entrecruzante se seleccionó el glutaraldehído. La optimización de la concentración de agente precipitante y agente entrecruzante se realizó a través de un diseño factorial multinivel 3³,

donde además se evaluó la influencia del grado de modificación de las enzimas sobre la actividad catalítica en la hidrólisis del p-NPB. La tabla 4 resume las condiciones experimentales del diseño multifactorial.

Tabla 4. Condiciones experimentales en la selección de variables significativas para la optimización de CLEAs

<i>Factor</i>	Nivel Bajo (-1)	Nivel Medio (0)	Nivel Alto (1)
Grado de Modificación (%)	20	50	100
Concentración del Agente Precipitante (v/v%)	50	70	90
Concentración del Agente Entrecruzante (v/v%)	0.5	1	1.5

Los resultados obtenidos para la optimización del grado de modificación, concentración del agente precipitante y concentración del agente entrecruzante, se exponen en la tabla 5. 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 5. Matriz de resultados de la elaboración de los agregados entrecruzados en la optimización del grado de modificación, concentración del agente precipitante y agente entrecruzante. El 100% de actividad relativa corresponde a: 126.9 U/mg para CRL.

No. Experiencia	Grado de Modificación	Agente Precipitante	Agente Entrecruzante	Actividad Relativa%
1	1	0	-1	88.5
2	-1	0	-1	33.2
3	-1	-1	1	98.9
4	1	1	1	125.9
5	1	0	1	67.0
6	1	-1	-1	34.8
7	0	-1	1	25.3
8	0	0	0	68.3
9	1	0	0	59.0
10	-1	1	-1	76.9
11	-1	-1	-1	2.4
12	-1	0	0	4.7
13	1	1	-1	78.9
14	1	-1	1	69.4
15	0	-1	-1	33.5
16	0	0	-1	29.3
17	-1	1	1	79.0
18	0	1	1	89.8
19	1	-1	0	38.7
20	-1	0	1	40.3
21	-1	-1	0	38.4
22	0	1	-1	99.2
23	-1	1	0	87.6
24	0	1	0	55.3
25	0	-1	0	43.2
26	0	0	1	52.4
27	1	1	0	167.9

Con los resultados obtenidos de la tabla 5, se realizó un análisis estadístico de varianza a fin de determinar los factores que influyen significativamente sobre la preparación de los CLEA. El gráfico de Pareto muestra cada uno de los efectos estimados de las variables y sus interacciones en orden

decreciente de magnitud sobre la actividad relativa de agregados entrecruzados de CRL-A. 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 [11]. La línea vertical que aparece permite determinar qué efectos son estadísticamente significativos en un 95% de confianza. La figura 16, muestra el grafico de Pareto para el proceso de elaboración de agregados entrecruzados.

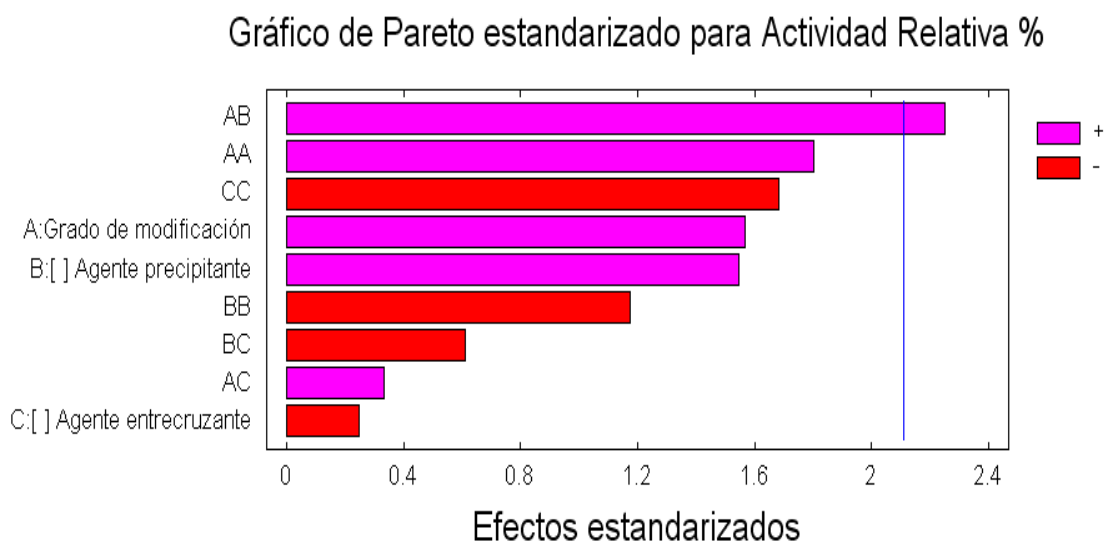


Figura 16. Diagrama de Pareto en la optimización de los agregados entrecruzados de CRL-aminada.

La figura 12 muestra que el grado de modificación y la concentración del *t*-butanol, ejercen una influencia significativa sobre la actividad de los agregados entrecruzados de CRL-aminada.

El análisis de varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos en la “matriz de resultados” 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 actividad relativa de los agregados entrecruzados de CRL-aminados. El valor estadístico P para efecto de las variables, indica niveles de confiabilidad del 99%. La tabla 6 resume el análisis de ANOVA.

Tabla 6. Datos de ANOVA para la optimización del CLEA de CRL-aminada

VARIABLE	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	P-VALOR
AB	5.058E+03	1	0.00377
Error total	2.972E+04	25	
Total (corr)	3.478E+04	26	

De la tabla 6, se puede inferir que AB, que representa a las interacciones entre el grado de modificación y la concentración del agente precipitante, presenta valores de P significativos al nivel 0.01, lo cual argumenta que tienen efecto sobre la actividad relativa de los agregados entrecruzados de CRL-aminada.

Las Figuras 17 y 18, muestran la superficie de respuesta y de contorno para las experiencias en búsqueda de la optimización de las variables ya mencionadas. A través de estos gráficos se estimó la combinación de niveles en los factores que permiten maximizar la actividad específica de los agregados entrecruzados.

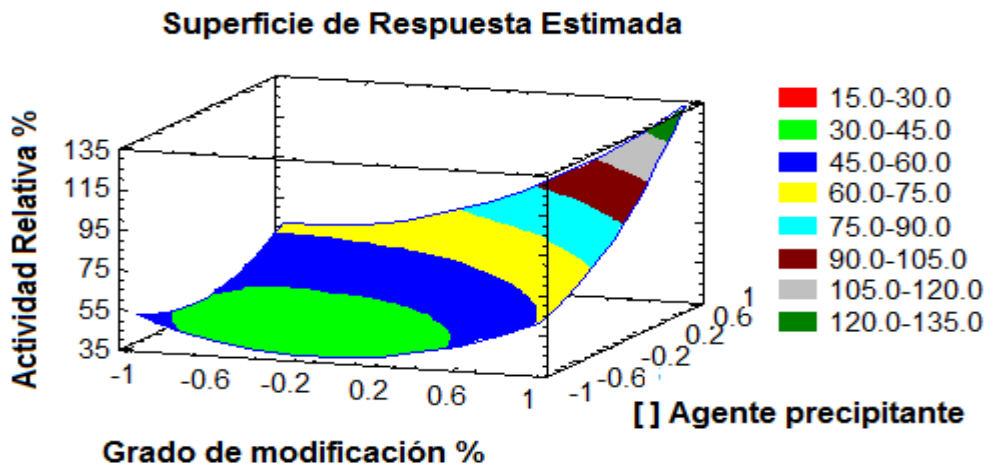


Figura 17. Superficie de respuesta en la optimización de los agregados entrecruzados de CRL-aminada.

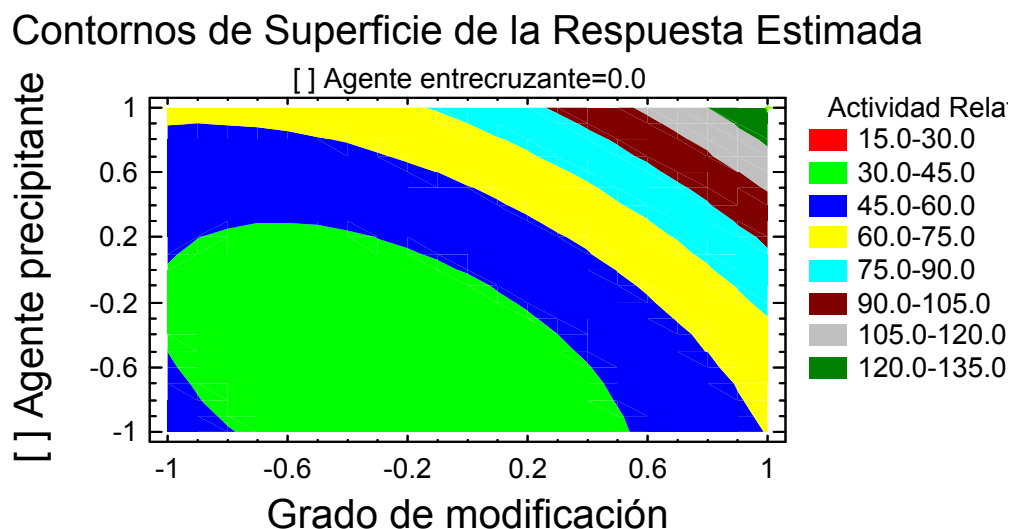


Figura 18. Contorno de superficie de respuesta en la optimización de los agregados entrecruzados de la CRL-aminada.

Se determinó que para una concentración de proteína de 25 mg/mL, el grado de modificación del 100%, t-butanol al 90% (v/v) y de glutaraldehído del 1.5% (p/v), se obtendría la máxima actividad de los agregados entrecruzados para la enzima modificada por aminación.

3.5.2 CLEA de QL-A

De manera similar se optimizaron las condiciones para la elaboración de los CLEA para la QL aminada. Las condiciones experimentales para el diseño multinivel 3³, se muestran en la tabla 4, evaluando el grado de modificación, la concentración del agente precipitante y la concentración del agente entrecruzante.

Los resultados obtenidos para la optimización del grado de modificación, concentración del agente precipitante y concentración del agente entrecruzante, se exponen en la tabla 7. En este caso, la actividad relativa es

la actividad del CLEA obtenida en relación a la actividad de la enzima soluble bajo las mismas condiciones experimentales.

Tabla 7. Matriz de resultados de la elaboración de los agregados entrecruzados en la optimización del grado de modificación, concentración del agente precipitante y agente entrecruzante. El 100% de actividad relativa corresponde a: 19.6 U/mg para QL.

No. Experiencia	Grado de Modificación	Agente Precipitante	Agente Entrecruzante	Actividad Relativa%
1	1	0	-1	73.4
2	-1	0	-1	28.3
3	-1	-1	1	82.5
4	1	1	1	109.3
5	1	0	1	44.6
6	1	-1	-1	23.5
7	0	-1	1	10.9
8	0	0	0	54.2
9	1	0	0	43.7
10	-1	1	-1	65.3
11	-1	-1	-1	0
12	0	-1	-1	25.6
13	1	1	-1	76.1
14	1	-1	1	51.3
15	-1	0	0	0
16	0	0	-1	20.3
17	-1	1	1	57.3
18	0	1	1	92.5
19	1	-1	0	20.4
20	-1	0	1	34.5
21	-1	-1	0	31.6
22	0	1	-1	67.4
23	-1	1	0	75.3
24	0	1	0	5.3
25	0	-1	0	43.2
26	0	0	1	52.4
27	1	1	0	127.8

Con los resultados obtenidos de la tabla 7, se realizó un análisis estadístico de varianza a fin de determinar los factores que influyen significativamente

sobre la preparación de los CLEA. En la figura 19, se muestran el gráfico de Pareto el proceso de elaboración de los agregados entrecruzados.

Gráfico de Pareto estandarizado para % Actividad Relativa

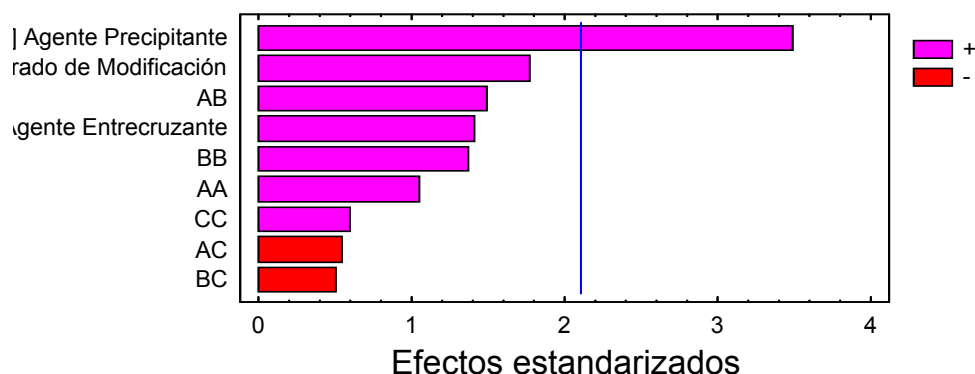


Figura 19. Diagrama de Pareto en la optimización de los agregados entrecruzados de QL-aminada.

De manera similar al caso de CRL, la figura 15 muestra que la concentración del *t*-butanol, ejerce una influencia significativa sobre la actividad de los agregados entrecruzados de QL-aminada.

En la tabla 8, se muestran los resultados de análisis de varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos en la “matriz de resultados”, el cual permitió determinar el grado de significancia de cada uno de los efectos.

Tabla 8. Datos de ANOVA para la optimización del CLEA de QL-aminada

VARIABLE	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	P-VALOR
A	7.166E+03	1	0.0088
B	8.56E+03	1	0.0057
Error total	2.314E+04	24	
Total (corr)	3.847+04	26	

De la tabla 8, se puede inferir que A, que representa al grado de modificación y B que representa la concentración del agente precipitante, presenta valores de P significativos al nivel 0.01, lo cual indica que tienen efecto sobre la actividad relativa de los agregados entrecruzados de QL-aminada.

Las Figuras 20 y 21, muestran la superficie de respuesta y de contorno de los resultados obtenidos, para la optimización de las variables ya mencionadas.

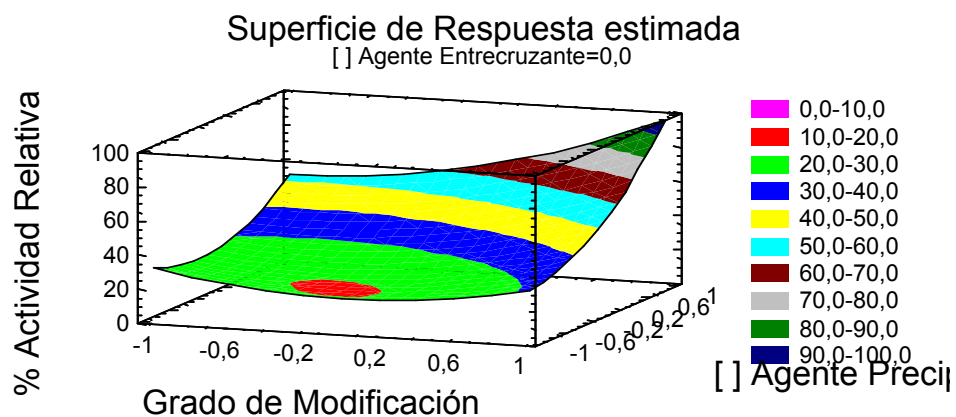


Figura 20. Superficie de respuesta en la optimización de los agregados entrecruzados de QL-aminada.

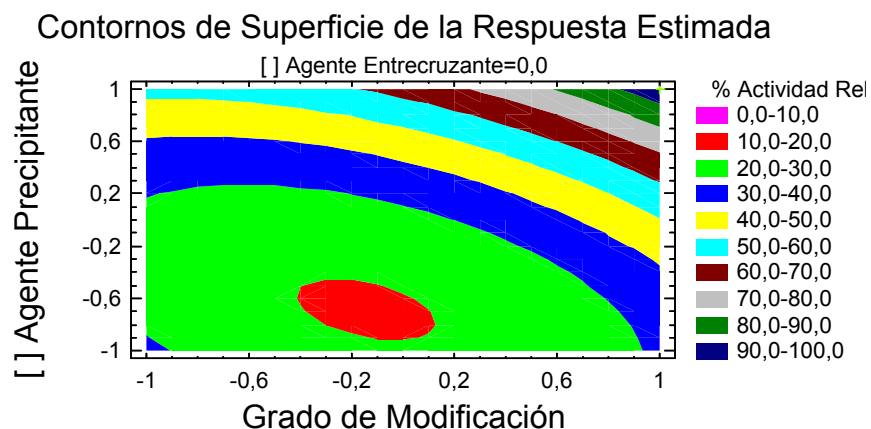


Figura 21. Contorno de superficie de respuesta en la optimización de los agregados entrecruzados de la CRL-aminada.

Se determinó que para una concentración de proteína de 25 mg/mL, el grado de modificación del 100%, t-butanol al 90% (v/v) y de glutaraldehído del 1.5% (p/v), se obtendría la máxima actividad de los agregados entrecruzados para la QL modificada.

Para la validación de esta aproximación, se elaboraron los agregados entrecruzados de CRL y QL modificadas, bajo estas condiciones obteniéndose una actividad relativa de 145.8% para CLEA-CRL-A y de 133.5% para el CLEA-QL-A (ver tabla 9), es decir, aumentaron en un factor aproximado a 1.5 con lo cual se corroboró el aumento de la actividad del agregado en comparación con la enzima soluble, y por lo tanto también aumenta la actividad después de la modificación.

Tabla 9. Actividades relativas para los CLEAs optimizados de CRL y QL aminadas. La actividad relativa se define como la actividad expresada de la enzima modificada comparada con la enzima soluble. El 100% de actividad relativa corresponde a: 126.9 U/mg y 19.6 U/mg, para CRL y QL respectivamente.

Derivados enzimáticos	Actividad relativa (%)	
	CRL	QL
Enzima soluble	100	100
E. Modificada 100%	68.72	35.75
CLEA Enz-Modif.	145.8	133.5

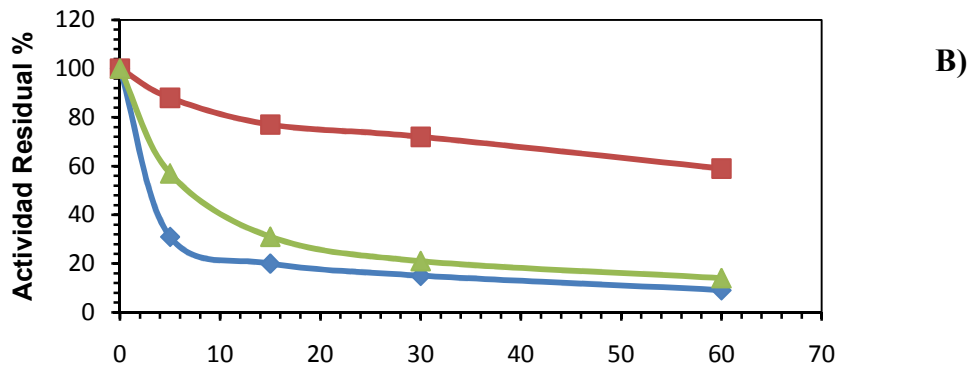
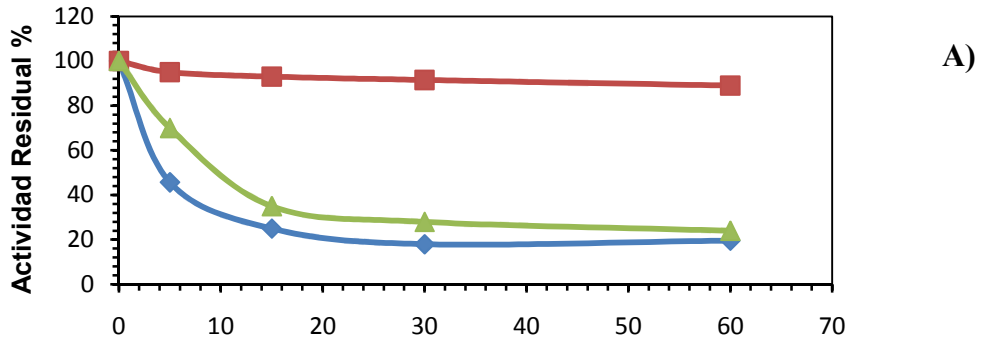
Al parecer este aumento de la actividad expresada por el CLEA puede indicar que las enzimas aminadas se entrecruzan de una manera eficaz debido a la presencia de nuevos grupos amino en la superficie de la enzima que reaccionan con el glutaraldehído [35], promoviendo una mejor insolubilización de la enzima, haciendo que este CLEA sea más activo en la hidrólisis de p-NPB.

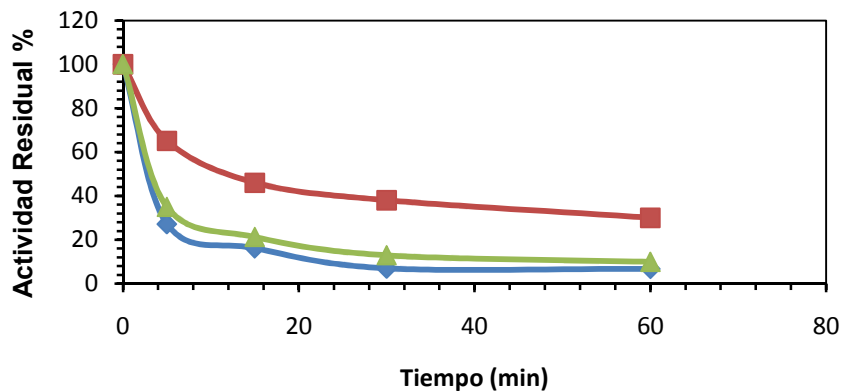
3.6 Estabilidad térmica de los derivados enzimáticos (EC-EDA-CRL-S, EC-EDA-QL-S, CLEA-CRL-A y CLEA-QL-A)

Con el fin de evaluar el efecto que ocasiona la modificación química y las estrategias de insolubilización e inmovilización sobre la estabilidad de los diferentes derivados obtenidos, se evaluó entonces la estabilidad térmica de estos derivados.

3.6.1 Estabilidad térmica de EC-EDA-CRL-S y EC-EDA-QL-S

Inicialmente se evaluó la estabilidad térmica de la enzima en su forma soluble y los derivados inmovilizados de las enzimas modificadas. En la figura 22, se muestran las cinéticas de inactivación de las enzimas CRL en su forma soluble, la CRL succinilada y del derivado EC-EDA-CRL-S.





C)

Figura 22. Estabilidad térmica a: A) 70°C, B) 80°C y C) 90°C. (◆) CRL; (▲) CRL-S; (■) EC-EDA-CRL-S. Los experimentos se desarrollaron como se indica en la parte experimental

Se puede apreciar en la figura 22a, que para un tiempo de incubación de una hora a temperatura de 70°C la enzima soluble y la enzima succinilada han perdido un porcentaje alto de su actividad (>75%), mientras que el derivado inmovilizado conserva 90% de su actividad inicial, siendo este el derivado más estable frente al aumento de la temperatura.

El incremento en la temperatura de incubación a 80 °C y 90 °C ocasiona una drástica disminución de la actividad catalítica de la enzima en su forma soluble (90% y 95%, respectivamente). Asimismo, la enzima succinilada presentó una drástica disminución de su actividad a 90 °C, perdiendo un 85% de su actividad inicial. En cambio, el derivado inmovilizado retuvo hasta un 90% de su actividad enzimática inicial al ser incubado a 70 °C, y 30% a 90°C, lo cual refleja el aumento de la estabilidad de la enzima producto de la alta rigidificación de ésta sobre el soporte [19, 33] . Estos resultados se pueden confirmar con la tabla 10, la cual muestra las constantes de inactivación de la forma soluble de CRL, la CRL succinilada y del derivado succinilado inmovilizado en EC-EDA

Tabla 10. Constantes de inactivación térmica de CRL soluble, CRL succinilada y de EC-EDA-CRL-S.

Derivado	$k_{\text{inactivación}} (\text{min}^{-1})$		
	70 °C	80 °C	90 °C
Enzima soluble CRL	0.0221	0.0334	0.0421
Enzima CRL-S	0.0187	0.0298	0.0401
EC-EDA-CRL-S	0.0035	0.0047	0.0088

En la tabla 10 se muestra el efecto de la temperatura sobre las constantes de inactivación de la enzima CRL en su forma soluble, succinilada e inmovilizada en EC-EDA. Se puede observar que el derivado inmovilizado posee las menores constantes de inactivación para cada una de las temperaturas en los experimentos realizados, obteniéndose entonces que el derivado inmovilizado de la enzima succinilada, EC-EDA-CRL-S incubado a una temperatura de 70°C es 6 veces más estable que la enzima CRL en su forma soluble. Asimismo al llegar a una temperatura de 90°C, el derivado inmovilizado es 5 veces más estable que la enzima en su forma soluble.

De manera similar se determinó la estabilidad térmica de la enzima QL en su forma soluble, QL succinilada y del derivado inmovilizado de QL succinilada. Las cinéticas de inactivación a las distintas temperaturas se muestran en la figura 23.

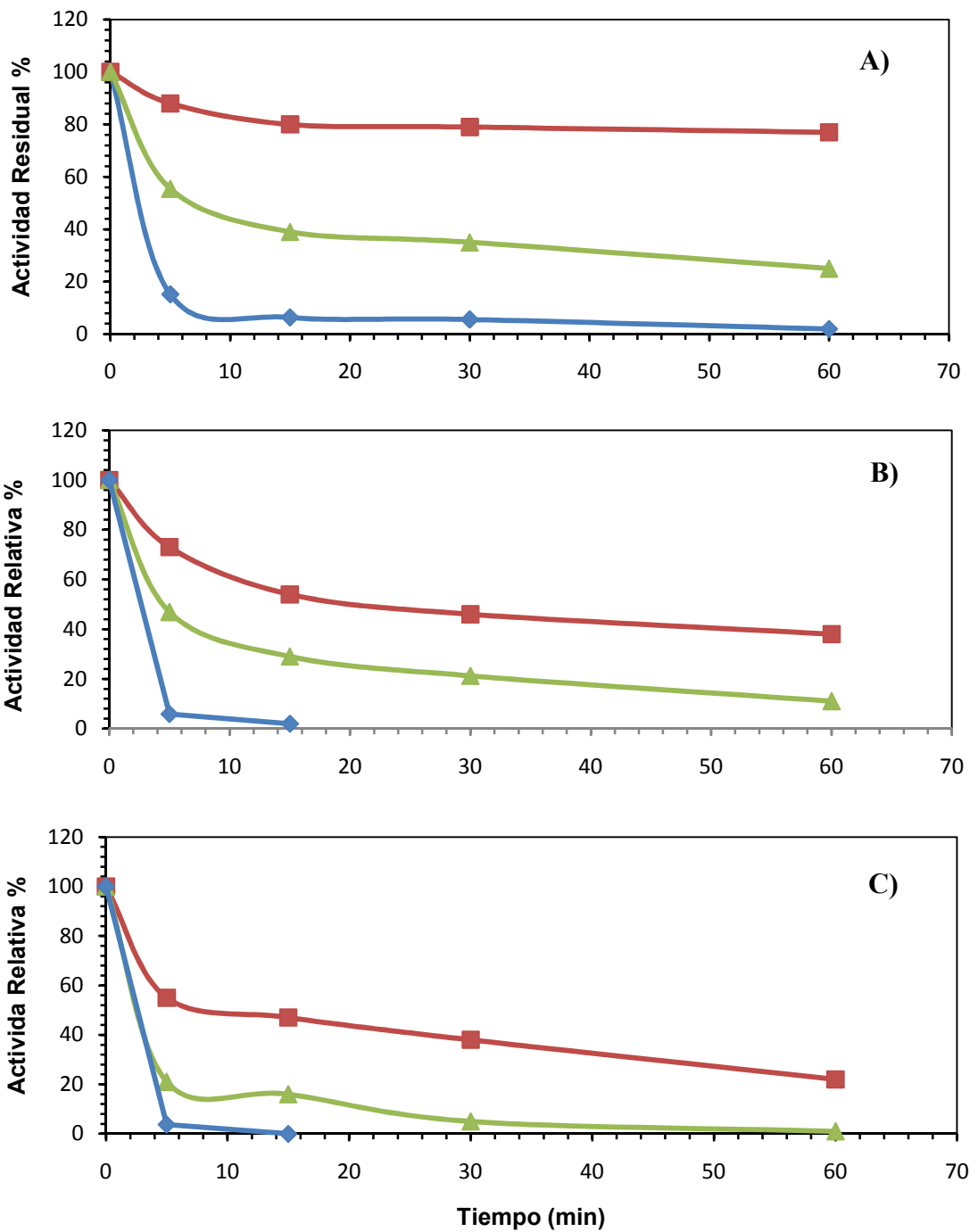


Figura 23. Estabilidad térmica a: A) 70°C, B) 80°C y C) 90°C. (♦)QL; (▲)QL-S; (■) EC-EDA-QL-S. Los experimentos se desarrollaron como se indica en la parte experimental.

En la figura 23, se puede apreciar nuevamente, que el derivado inmovilizado presenta una mayor estabilidad al aumento de la temperatura, y como consecuencia mantiene más la actividad catalítica de la enzima; aunque se aprecia que la QL succinilada posee una mayor estabilidad térmica significativa.

Si comparamos esta enzima QL con la enzima CRL, esta última presenta ser más estable a temperaturas entre 70 y 90 °C, por lo tanto retiene mayor la actividad. Posiblemente, la CRL posee una estructura terciaria más rígida que le confiere dicha estabilidad. En la tabla 11, se presenta la constante de inactivación para el derivado inmovilizado de QL-S y para la enzima soluble, mostrando que esta constante es menor para el derivado, y por lo tanto este derivado es más estable casi 9 veces con respecto a la enzima soluble.

Tabla 11. Constantes de inactivación térmica de QL soluble, QL succinilada y de EC-EDA-QL-S

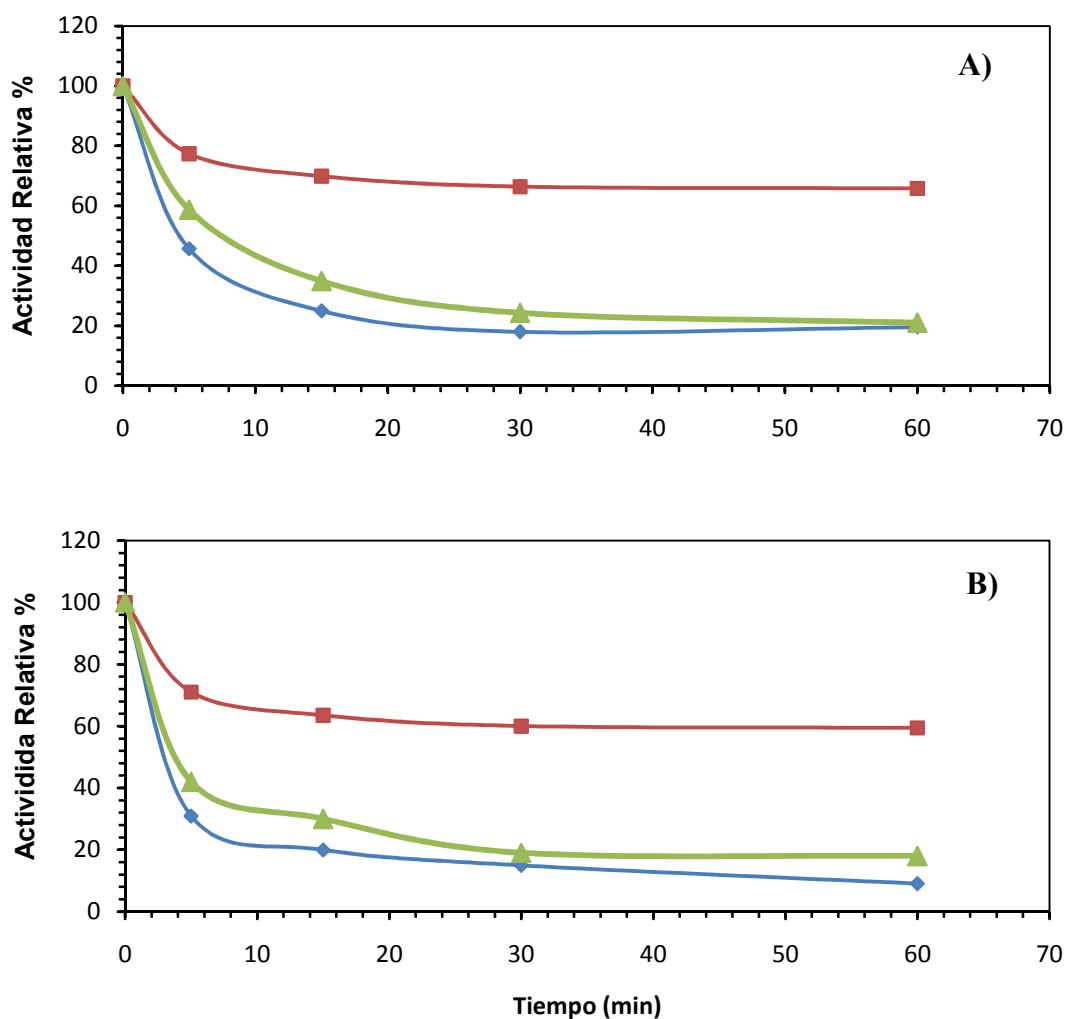
Derivado	$K_{\text{inactivación}} \text{ (min}^{-1}\text{)}$		
	70 °C	80 °C	90 °C
Enzima soluble QL	0.0818	0.198	0.323
Enzima QL-S	0.0564	0.0539	0.139
ED-EDA-QL-S	0.0093	0.0127	0.0187

Se observa que la inmovilización en este tipo de soporte le confiere a la enzima una mayor estabilidad, producto de la rigidez adquirida por la formación de enlaces covalentes entre grupos reactivos de la enzimas con el soporte multifuncional [33]. Es decir, al aumentar el número de puntos de unión entre la enzima y el soporte, la rigidez que obtiene la enzima va a ser mayor, lo cual se verá reflejado en una menor distorsión de su estructura tridimensional [19, 33]. Esto implica que se dará más lentamente la inactivación por desnaturalización de la enzima soportada, frente al aumento

de la temperatura. De esta manera se demuestra la efectividad de la inmovilización como técnica de estabilización de las enzimas.

3.6.2 Estabilidad térmica del CLEA-CRL-A y CLEA-QL-A.

En la Figura 24, se muestra la cinética de inactivación de CRL aminada y la CRL en su forma soluble, así como de los derivados insolubilizados. Se puede apreciar claramente que los CLEAs de CRL modificada conservaron un mismo orden de estabilidad para cada rango de temperaturas estudiadas, mostrando ser más estables que la enzima soluble.



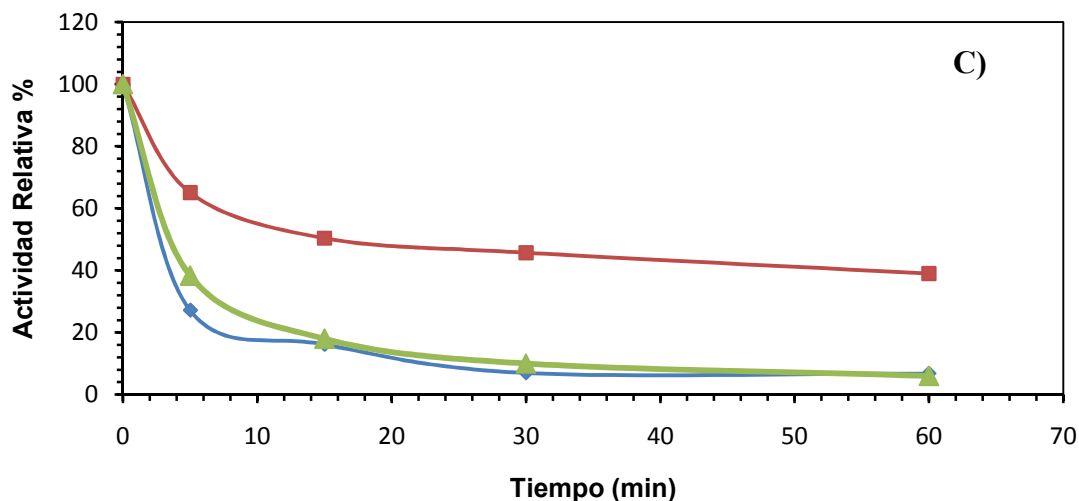


Figura 24. Estabilidad térmica a: A. A) 70°C, B) 80°C y C) 90°C. (♦)CRL; (▲) CRL-A; (■) CLEA-CRL-A. Los experimentos se desarrollaron como se indica en la parte experimental

Al analizar detenidamente las cinéticas de inactivación obtenidas a las diferentes temperaturas estudiadas se encuentra lo siguiente: i) Luego de una hora de incubación a 70 °C el CLEA de CRL-A perdió casi un 40% de su actividad. Mientras que la enzima soluble perdió un 80%, siendo altamente inestable a 70 °C. ii) Con el aumento de la temperatura a 90 °C, el CLEA de CRL-A perdió hasta un 60% de su actividad siendo aún más estable que la enzima soluble y la enzima aminada que perdieron más del 90% de sus actividad, demostrando así su desnaturalización por efecto de la temperatura.

La estabilidad térmica que poseen estos agregados enzimáticos se atribuye al entrecruzamiento intermolecular e intramolecular, del glutaraldehído con las grupos amino 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, una mayor resistencias a los cambios conformacionales (cambios en su estructura tridimensional) que puedan ser producidos por el aumento

de la temperatura [27], y como consecuencia se obtiene un derivado donde se retiene la actividad catalítica de la enzima.

En la tabla 12, se presentan las constantes de inactivación para el derivado insolubilizado de CRL-A y la CRL en su forma soluble. Podemos observar de manera similar a los resultados de los derivados inmovilizados, que las constantes de inactivación son menores para los agregados entrecruzados. Se tiene entonces que el agregado entrecruzado de CRL aminada incubado a 70°C es 4 veces más estable que la enzima CRL en su forma soluble. Para el experimento a una temperatura de 90°C el agregado entrecruzado es casi 6 veces aun más estable que la enzima CRL en su forma soluble. Esto indica posiblemente que el CLEA-CRL-A pueda ser sometido a mayores temperaturas sin una pérdida significativa de la actividad catalítica de la enzima entrecruzada.

Tabla 12. Constantes de inactivación térmica de CRL soluble, CRL aminada y del CLEA-CRL-A.

Derivado	$K_{\text{inactivación}} \text{ (min}^{-1}\text{)}$		
	70 °C	80 °C	90 °C
Enzima soluble CRL	0.0221	0.0334	0.0421
Enzimas CRL-A	0.0176	0.0294	0.0409
CLEA-CRL-A	0.0053	0.0063	0.0076

A continuación en la Figura 25, se muestran las cinéticas de inactivación para la enzima QL en su forma soluble, la QL aminada y el agregado entrecruzado de QL aminada.

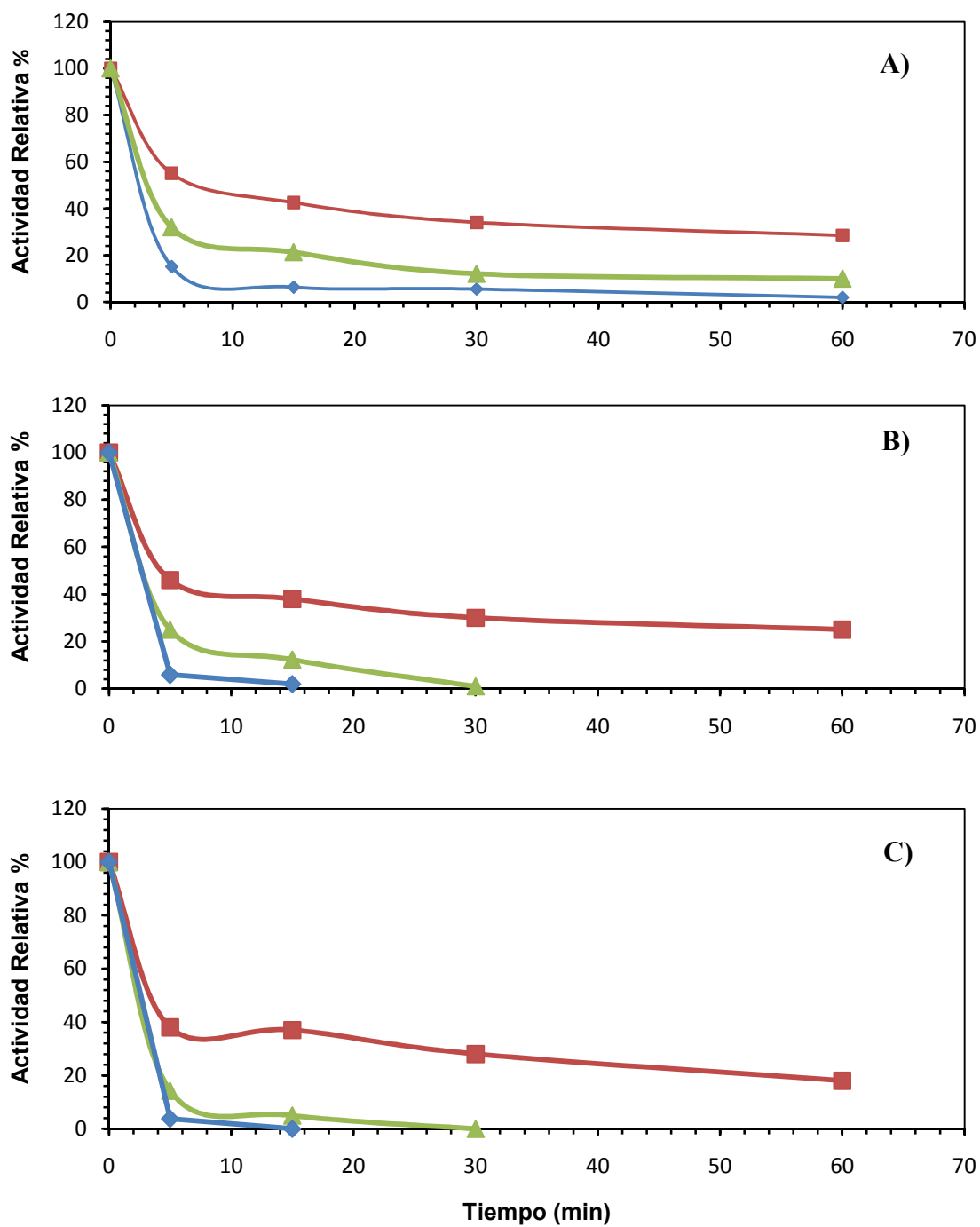


Figura 25. Estabilidad térmica a: A) 70°C, B) 80°C y C) 90°C. (◆) QL; (▲) QL-A; (■) CLEA-QL-A. Los experimentos se desarrollaron como se indica en la parte experimental.

Se observa que la enzima QL en su forma soluble y la QL aminada, a 70 °C presentan una inactivación de más del 80%, a tan solo 10 min de la incubación a dicha temperatura. A temperaturas mayores presenta una inactivación total, es decir, a estas temperaturas la enzima pierde fácilmente su estructura terciaria desnaturalizándose.

En contraste el CLEA de QL aminada, presentó mayor estabilidad a las temperaturas evaluadas, que la enzima soluble. Una vez más, se observa que los agregados entrecruzados confieren al derivado una mayor estabilidad térmica, puesto que la conformación ahora es más rígida y por tanto más estable [18, 27].

Estos resultados se pueden corroborar al analizar las constantes de inactivación que se presentan en la tabla 13.

Tabla 13. Constantes de inactivación térmica de QL soluble y de lo CLEA-QL-A.

Derivado	$K_{\text{inactivación}} (\text{min}^{-1})$		
	70 °C	80 °C	70 °C
Enzima soluble QL	0.0818	0.198	0.323
Enzimas QL-A	0.0683	0.0961	0.298
CLEA-QL-A	0.0173	0.0258	0.0294

Se tiene también que el derivado insolubilizado, es decir, el CLEA-QL-A, presenta las menores constantes de inactivación al aumento de la temperatura. En este mismo sentido, el agregado de entrecruzado incubado a una temperatura de 70°C es 4 veces más estable que la enzima QL en su forma soluble incuba a la misma temperatura. Al aumentar la temperatura a

90°C, el agregado entrecruzado de QL aminada, presenta ser 11 veces más estable que la enzima QL en su forma soluble.

Es importante destacar que para todos los casos las enzimas modificadas presentaron un curso de inactivación similar a la enzimas en su estado soluble, sugiriendo así, que la estabilidad térmica de los derivados inmovilizados posiblemente se debe a la inmovilización e insolubilización de las enzimas mediante las dos estrategias bajo estudio [43].

En la figura 26, es posible observar la comparación de los distintos derivados insolubilizados e inmovilizados, en la inactivación térmica a las tres diferentes temperaturas.

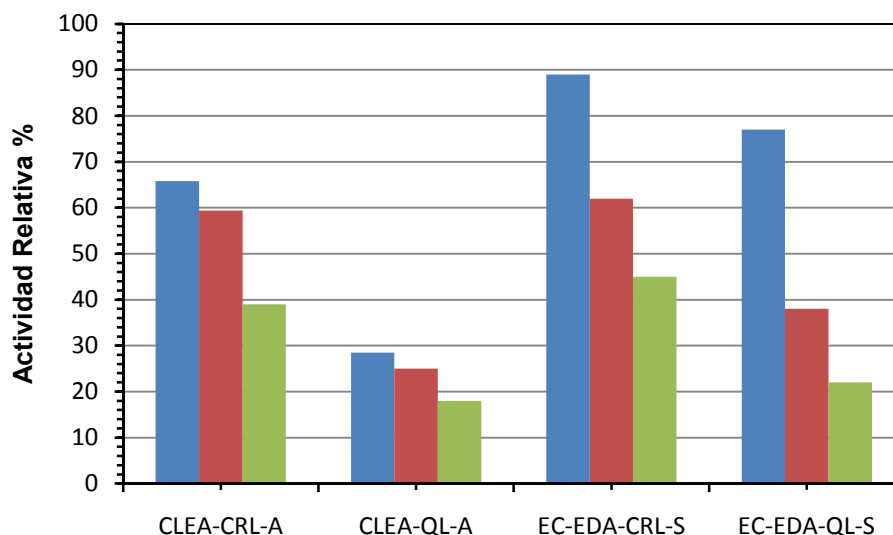


Figura 26. Comparación de las actividades relativas de los derivados enzimáticos a 1h de incubación. (■) 70 °C; (■) 80 °C y (■) 90 °C.

Si se compara, la insolubilización de las enzimas por medio de los agregados enzimáticos entrecruzados, con la inmovilización de las enzimas sobre soporte parcialmente aminado, podemos resaltar que los derivados

obtenidos a través de la inmovilización sobre soporte presentan mayor estabilidad térmica. Esto puede deberse a que la inmovilización sobre este tipo de soportes genera una mayor rigidez estructural de la enzima en su forma 3D [19].

3.7 Hidrólisis del (R/S)-mandelato de metilo catalizada por los derivados modificados de CRL y QL

Se evaluó la actividad catalítica y la enantioselectividad de los distintos derivados enzimáticos obtenidos, tras la modificación química y su inmovilización e insolubilización, en la hidrólisis del mandelato de metilo.

3.7.1 Actividad catalítica de los derivados modificados de CRL y QL en la hidrólisis del mandelato de metilo.

La primera propiedad catalítica analizada para los distintos derivados inmovilizados después de su modificación química de CRL y QL, fue la actividad específica en la reacción de hidrólisis de mandelato de metilo. La figura 27, muestra la cinética de la reacción de hidrólisis del (R/S)-Mandelato de metilo catalizada por los derivados modificados de las dos enzimas en estudio, CRL y QL.

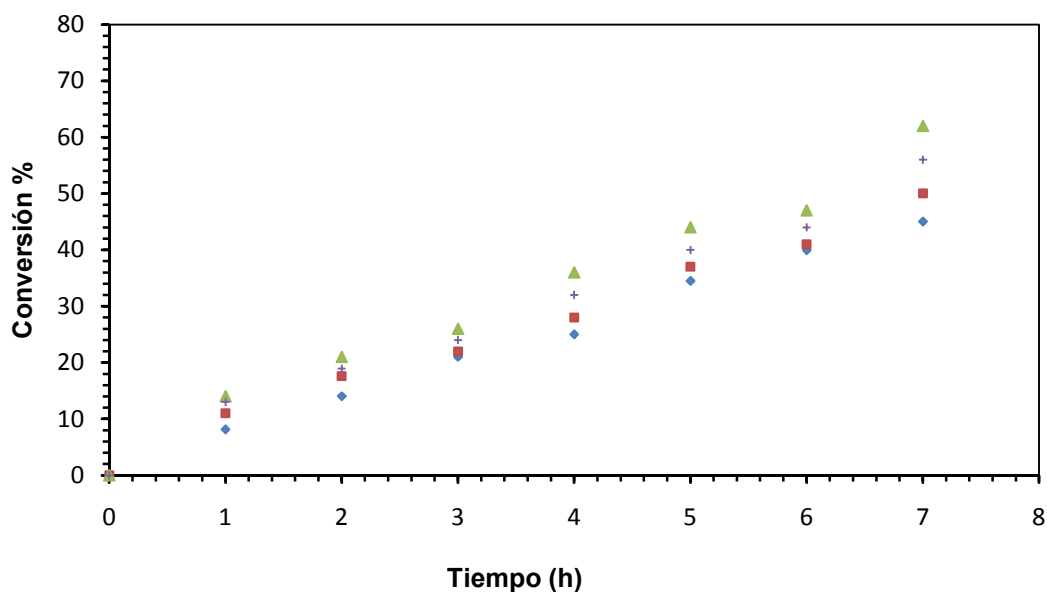


Figura 27. Cinética de la reacción de hidrólisis de (R/S)-Mandelato de metilo catalizada por derivados modificados de CRL y QL. Las reacciones se desarrollaron como se indica en métodos experimentales. Los derivados utilizados fueron los siguientes: (◆) CLEA-CRL-A; (■) CLEA-QL-A; (▲) EC-EDA-CRL-S; (+) EC-EDA-QL-S.

Como se puede observar en la figura 27, el derivado EC-EDA-CRL-S mostró la actividad más elevada en la hidrólisis del (R/S)-Mandelato de metilo, logrando una conversión del 62% a las 8 horas de reacción. Esta actividad del derivado es posible quizás a la estabilidad y orientación que adquiere la enzima al ser inmovilizada sobre un soporte de este tipo (EC-EDA), ya que posiblemente ocasiona un desplazamiento de la tapadera o *lid* exponiendo de esta manera el sitio activo de la enzima al medio de reacción [9, 22, 40].

Se observa claramente en la tabla 14, que el derivado que presenta mayor actividad es el EC-EDA-CRL-S, seguido del derivado EC-EDAQL-S, y a su vez por los derivados CLEA QL-A y CLEA CRL-A en su respectivo orden.

Tabla 14. Actividad específica derivados de CRL y QL, catalizando la hidrólisis (S)-mandelato de metilo. La actividad se definió como: ($\mu\text{mol}/\text{min.mgbiocatalizador}$).

Derivados Inmovilizados	Actividad Especifica (U/mg)
CLEA CRL-A	5.59
CLEA QL-A	7.8
EC-EDA CRL-S	8.54
EC-EDA QL-S	8.01

Estos resultados concuerdan con lo reportado en investigaciones anteriores [19, 27], ya que ensayos realizados con estas estrategias de inmovilización muestran que soportes como EC-EDA, permiten que el derivado exhiba una mayor actividad catalítica comparada con la estrategia de insolubilización por CLEA.

La modificación química de las enzimas CRL y QL seguidas de su inmovilización e insolubilización, son estrategias, que aunque son diferentes, permitieron modular la actividad debido a la rigidez y orientación que le confieren a la enzima [11, 34].

3.7.2 Enantioselectividad de los distintos derivados de CRL y QL catalizando la hidrólisis de mandelato de metilo

La propiedad catalítica más interesante de las lipasas es la enantioselectividad frente a sustratos quirales. En este caso, se analizó el efecto de la modificación química y la inmovilización e insolubilización, sobre la enantioselectividad de las lipasas CRL y QL en la hidrólisis de (R/S)-mandelato de metilo (Figura 28).

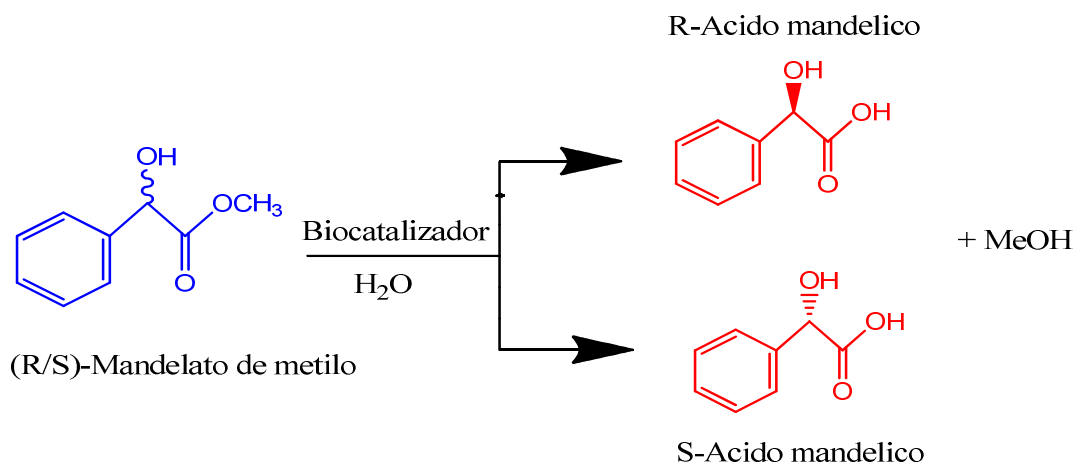


Figura 28. Hidrólisis enantioselectiva del (R/S)-Mandelato de metilo [27].

Se pueden observar los resultados obtenidos en las condiciones experimentales (25°C y pH 7) en la tabla 15. Todos los derivados inmovilizados presentaron una preferencia estereoquímica similar, hidrolizando el isómero S. El derivado EC-EDA-CRL-S fue el más enantioselectivo (E=14) seguido del derivado EC-EDA-QL-S (E=12)

Tabla 15. Enantioselectividad de los derivados inmovilizados de CRL y QL en la hidrólisis de (±)-mandelato de metilo a 25°C y pH 7.

Derivados Inmovilizados	ENANTIOSELECTIVIDAD			
	C%	ee _p (%)	E	EP
CLEA CRL-A	24.1	68	7	S
CLEA QL-A	24.2	61	6	S
EC-EDA CRL-S	26.6	81	14	S
EC-EDA QL-S	24.1	75	12	S

ee_p= exceso enantiomérico del producto

EP=Enantiopreferencia

En general, la inmovilización de las dos enzimas en estudio a través de las dos diferentes estrategias utilizadas, permitió la obtención de derivados con

una enantioselectividades diferentes, en la hidrólisis del mandelato de metilo. Los dos derivados de CRL y QL inmovilizados sobre soporte parcialmente modificados, EC-EDA-CRL-S (E=14) y EC-EDA-QL-S (E=12), presentaron ser más enantioselectivos que los CLEAs. Esto se debe posiblemente a que este tipo de soporte confiere a la enzima una mayor rigidez suficiente para evitar la distorsión del sitio activo de la misma en el momento de la catálisis generando tal vez una conformación que no impide estéricamente el acceso del enantiómero S [9, 17, 30]

A pesar que los derivados inmovilizados fueron sometidos a diferentes estrategias de ingeniería del derivado (La modificación química y diferentes métodos de inmovilización), la enantiopreferencia en la hidrólisis del mandelato de metilo no fue afectada, es decir, se obtuvo el enantiomero S-acido mandélico para todos los derivados enzimáticos.

Cabe resaltar que estos derivados inmovilizados en EC-EDA previamente sometidos a la reacción de succinilación, fueron los que presentaron mayor actividad y mayor enantioselectividad, mostrando que esta estrategia de modificación química es una técnica que permite obtener biocatalizadores con mejores propiedades catalíticas. Similares resultados fueron obtenidos [8] donde esta estrategia de modificación química por succinilación aumentó la enantioselectividad de la enzima evaluada (CAL-B), de E=1 a E=13 con un eep% del 83.

Por último, es importante destacar la enantiopreferencia de las dos enzimas evaluadas, puesto que se pudo obtener el enantiomero S en la hidrólisis del mandelato de metilo. Otros estudios realizados de diferentes enzimas como la lipasa B de *Candida antártica*, reportan enantiopreferencias al enantiomero R [10, 19, 27].

4. Conclusiones

1. Se obtuvieron biocatalizadores de lipasa de *Candida rugosa* (CRL) y *Alcaligenes sp.*(QL) modificados mediante reacciones de succinilación y aminación. Posteriormente, se inmovilizaron sobre soportes epóxido parcialmente aminado, e insolubilizaron mediante agregados enzimáticos entrecruzados. Los biocatalizadores obtenidos exhibieron diferentes enantioselectividades en la resolución cinética del mandelato de metilo racémico, sugiriendo que fue posible la modulación de las propiedades catalíticas de estas enzimas mediante técnicas de inmovilización y modificación química.
2. La modificación química ocasionó una disminución de la actividad catalítica de las enzimas CRL y QL. Sin embargo, mostró ser una herramienta versátil, puesto que se lleva a cabo en tiempos de reacción cortos y condiciones de reacción fácilmente controlables.
3. Los agregados entrecruzados elaborados de CRL y QL, aminadas, bajo condiciones óptimas, aumentaron los valores de actividad de las enzimas solubles en un factor de 0.5 y 0.3, respectivamente en la hidrólisis del p-NPB.
4. Las estrategias de insolubilización a través de agregados enzimáticos entrecruzados y la inmovilización de enzimas sobre soporte

multifuncionales, le confirieron a la enzima una mayor estabilidad, debido al cambio de la rigidez y orientación de las enzimas, modulándose así, esta propiedad catalítica, siendo los derivados enzimáticos inmovilizados sobre soporte, los más estables.

5. La inmovilización de las lipasas de CRL y QL, modificadas por reacciones de aminación y succinilación, mediante las técnicas de entrecruzamiento de agregados enzimáticos (CLEA), y la inmovilización en soporte epóxido parcialmente modificado (EC-EDA), permitió la modulación de las propiedades biocatalíticas de las enzimas. Esto se confirmó tras el uso de estos derivados en la resolución cinética del (R/S)-Mandelato de metilo.
6. Todos los derivados obtenidos en este trabajo lograron invertir la enantioselectividad en la resolución del (R/S)-Mandelato de metilo, en comparación con otra enzima estudiada en el grupo de investigación, CAL-B, obteniéndose mayoritariamente el enantiómero S-acido mandélico. El derivado EC-EDA CRL-S mostró tener el mayor valor de enantioselectividad con un valor de $E=14$.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAMPBELL, M., FARRELL, S., Bioquímica. Mexico. Thomson ed. 2004. 135-144.
2. GHANEM, A., HASSAN, Y., ENEIN, A. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron Asymmetry*. 2004, 15, 3331-3351.
3. GROCHULSKY, P., SCHRAGM, J., Insights into interfacial activation from an open structure of a *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* 1995, 268, 12843-12847.
4. BRZozowski, A.M., DEREWENDA, S., A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*. 1991, 351, 491-494
5. BASTIDA, A., SABUQUILLO, P., ARMISE, P., A single step purification, immobilization, and hiperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol. Bioeng.* 1998, 58, 486-493.
6. PALOMO J., FERNANDEZ-LORENTE, G., MATEO, C., ORTIZ, C., GUI SAN, J. M., Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic

resolution of mandelic acid esters. *Enzyme and microbial technology*. 2002, 31, 775–783

7. PLEISS, J., FISCHER, M., SCHMID, R., Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1998, 93, 67–80.
8. SABUQUILLO, P., REINA, J. FERNANDEZ-LORENTE, G., GUIBAN, J. M., FERNANDEZ-LORENTE, R., Interfacial affinity chromatography of lipases: separation of different fractions by selective adsorption on supports activated with hydrophobic groups. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1998, 75, 337-348.
9. BARBOSA, O., Resolución cinética de (R/S)-Propanolol y (R/S)-Atenolol vía reacciones de acetilación mediante la utilización de lipasas inmovilizadas. Tesis de Maestría. Universidad Industrial de Santander, 2009
10. PALOMO J., FERNANDEZ-LORENTE, G., GUIBAN, J. M., Modulation of Immobilized Lipase Enantioselectivity via Chemical Amination. *Adv. Synth. Catal.* 2007, 349, 1119 – 1127
11. CABRERA, Z., FERNANDEZ-LORENTE, G., PALOMO, J., Enhancement of Novozym-435 catalytic properties by physical or chemical modification. *Process Biochemistry*. 2009, 44, 226–231.
12. DAVIS, B., Chemical modification of biocatalysts. *Current Opinion in Biotechnology*. 2003, 14, 379–386.
13. CARRAWAY, K.L., KOSHLAND, D.E., Carbodiimide modification of proteins *Methods in Enzymology*. 1972, 37, 616-623

14. HOARE, D. G., KOSHLAND, D. E., A Method for the Quantitative Modification and Estimation of Carboxylic Acid Groups in Proteins. The journal of biological chemistry. 1967, 242, 2447- 2453
15. GEOGHEGAN, K. Current Protocols in Protein Science. John Wiley & Sons, Inc. 1996, 15.2.1-15.2.18
16. KLOTZ, I.M. Succinylation. Methods Enzymol. 1967, 23, 576-580.
17. MATEO, C., FERNANDEZ-LORENTE, G., ABIAN, O., Multifunctional Epoxy Supports: A New Tool To Improve the Covalent Immobilization of Proteins. The Promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage Biomacromolecules. 2000, 1, 739-745.
18. CAO, L., VAN LAGEN, L., SHELDON, R., Immobilised enzymes: carrier bound or carrier free?. Current Opinion in Biotechnology. 2003, 14, 4, 387-394
19. ESCORCIA, A., Resolución cinética de (R,S)-mandelato de metilo utilizando preparaciones inmovilizadas de lipasa de Candida antarctica B, Tesis de Grado, Universidad Industrial de Santander, 2008.
20. ARIZA, C. Desarrollo de nuevos soportes epóxido multifuncionales para la inmovilización de Candida antarctica B. Resolución cinética de (+/-)-propanolol. Tesis de Grado, Universidad Industrial de Santander, 2009.
21. OVERBEEKE, PLA, KOOPS BC, VERHEIJ HM, SLOTBOOM AJ, EGMOND MR, JONGEJAN JA, HEIJNEN JJ: Activity and enantioselectivity of modified lipases in organic solvents. Biocatal Biotransform 2000, 10, 385-393.

22. SHELDON, R., VAN RANTWIJK, F., SCHOEVAART, R., Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnology and bioengineering*. 2004, 6, 754-762
23. Migneault, I.; Dartiguenave, C. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site *Biotechniques*. 2004, 37, 790-802.
24. Chen, C.-S.; Wu, S.-H.; Girdaukas, G.; Sih, C. Bifunctional chiral synthons via biochemical methods. *J. J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 2812-2817.
25. GHANEM, ASHARAF; HASSAN Y.; Enein, Aboul. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron Asymmetry*. 2004, 78, 3331-3351.
26. LAEMMLI, U.K., Cleavage of structural proteins during de assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. 227, 680-685.
27. CRUZ LAITON, J., Hidrólisis enantioselectiva de (R/S)-mandelato de metilo catalizada por agregado enzimáticos entrecruzados (CLEAs) de lipasa de *Candida antarctica* B. Tesis de Grado, Universidad Industrial de Santander, 2008.
28. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-254.
29. GOLDSTEIN, L., Kinetic behavior of immobilized enzyme systems *Methods in Enzymology*. 1976, 44, 397-443
30. WILSON, L., PALOMO, J., FERNANDEZ-LORENTE, G., ILLANES, A., GUISAN, J., Effect of lipase–lipase interactions in the activity, stability

and specificity of a lipase from *Alcaligenes* sp. *Enzyme and microbial technology*, 2006, 39, 259-264

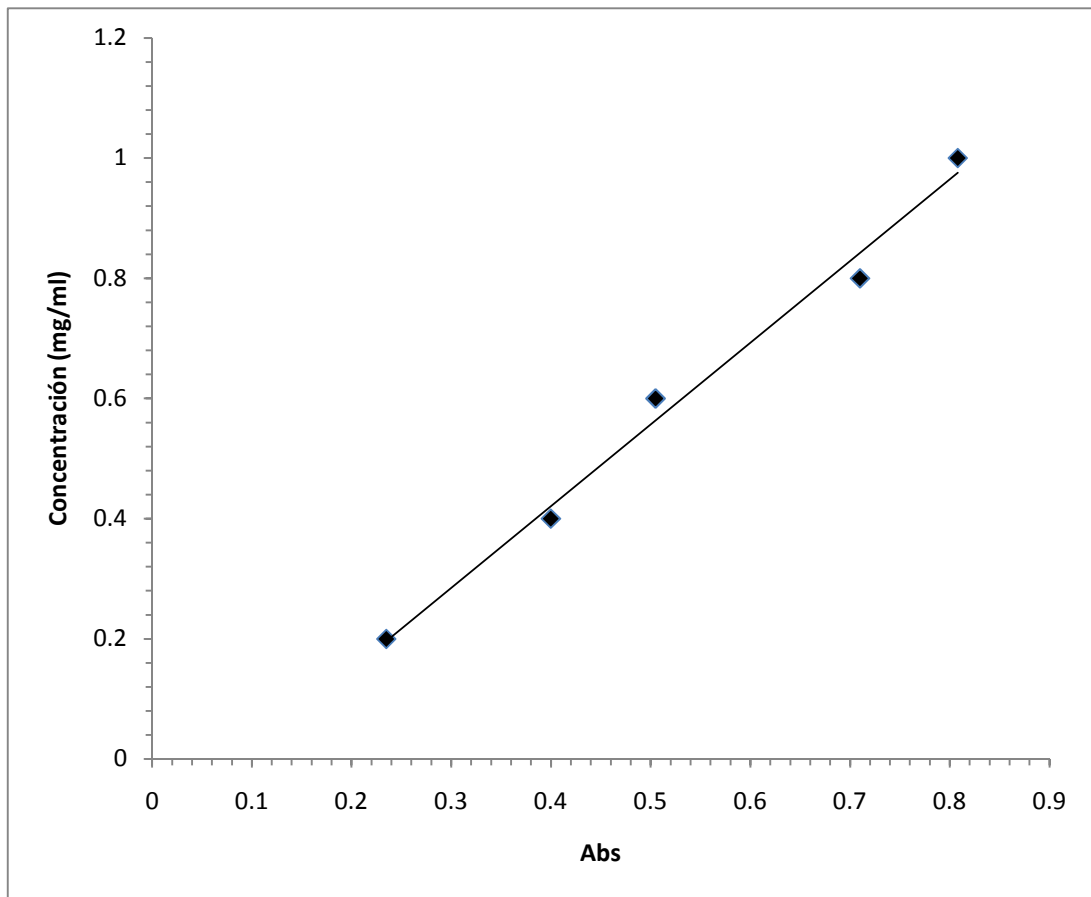
31. LOPEZ ORTIZ, C., *Ingeniería de biocatalizadores de lipasas: nuevos métodos de purificación y nuevos protocolos de modulación de propiedades funcionales*, Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, 2004.
32. PALOMO J., FERNANDEZ-LORENTE, G., GUIBAN, J. M., *Modulation of Immobilized Lipase Enantioselectivity via Chemical Amination*. *Adv. Synth. Catal.* 2007, 349, 1119–1127
33. TREVAN, M., *Immobilized enzymes an introduction and applications in biotechnology*, Wiley & Sons, 1980.
34. UEJI S, UEDA A, TANAKA H, WATANABE K, OKAMOTO T, EBARA Y: *Chemical modification of lipases with various hydrophobic groups improves their enantioselectivity in hydrolytic reactions*. *Biotechnol Lett* 2003, 2, 83-87.
35. BROWN, G.B., *Chemically aggregates enzymes*. *Methods in ezymology*, academic press. 1976. 44. 263-280.
36. COSTA, L. BRISSOS, A., LEMOS, F., CABRAL, J., *Comparing the effect of immobilization methods on the activity of lipase biocatalysts in ester hydrolysis*. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2008, 31, 323–327.
37. FERNANDEZ-LORENTE, G., GODOY, C., and MENDES, M., *Solid-phase chemical amination of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* to improve its stabilization via covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose*. *Biomacromolecules*. 2009, 44, 963-968.

38. FERNANDEZ-LORENTE, G., PALOMO, J., CABRERA, Z., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., GUIBAN, J., Glutaraldehyde cross-linking of lipases adsorbed on aminated supports in the presence of detergents leads to improved performance. *Biomacromolecules* 2006, 7, 2610-2615
39. GU Q-M, SIH C: Improving the enantioselectivity of the *Candida cylindracea* lipase via chemical modification. *Biocatal* 1992, 6:115-126.
40. PLEISS, J., FISCHER, M., SCHMID, R., Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids*. 93 (1998) 67–80
41. YANG, Z. C.; ZHOU, W. S. *Heterocycles*. 1997, 45, 367-383.
42. Kazuhiko, T.; Kazuo, O.; et al. *Chem. Pharm. Bull.* 1992, 40, 1415-1423. Falta título.
43. Lopez-Gallego, F., Montes, T., Fuentes, M., Guisan., J. M., Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. *Journal of Biotechnology*. 2005, 116, 1–10.

ANEXOS

Anexo A

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

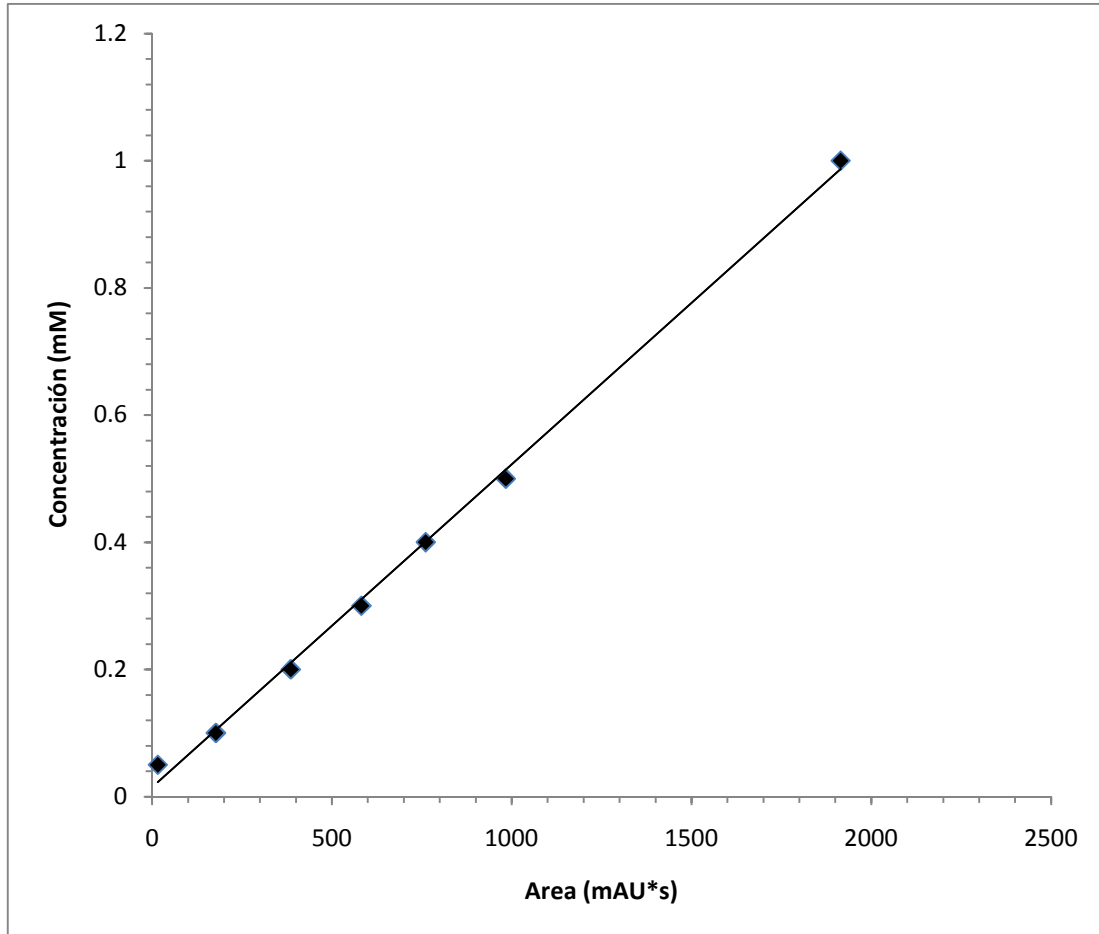


$$C=0.728 \text{ Abs} + 0.0948$$

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.



$$C = 0.0004 A + 0.0078$$

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

Anexo C

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

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

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

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

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

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

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

Anexo D

Cromatograma del (R,S)-Ácido mandélico ($t_R = 3.402$ min) y (R,S)-Mandelato de metilo ($t_R = 5.575$ min).

