MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOCATALÍTICAS DE LIPASAS MICROBIANAS MEDIANTE LA SÍNTESIS DE AGREGADOS ENZIMÁTICOS ENTRECRUZADOS (CLEAs)

MAGALY GALVIS JÁCOME, Qca

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN QUÍMICA

BUCARAMANGA

2012

MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOCATALÍTICAS DE LIPASAS MICROBIANAS MEDIANTE LA SÍNTESIS DE AGREGADOS ENZIMÁTICOS ENTRECRUZADOS (CLEAs)

MAGALY GALVIS JÁCOME, Qca

Trabajo de grado para optar el título de Magister en Química

DIRECTORES DE PROYECTO DE GRADO

RODRIGO TORRES SÁEZ, Ph.D

CLAUDIA CRISTINA ORTIZ, Ph.D

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN QUÍMICA

BUCARAMANGA

2012

A los doctores Rodrigo Torres, Claudia Ortiz y Roberto Fernández La-fuente.

A los compañeros de trabajo y amigos del Grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM).

A mi hermosa familia y al único Dios verdadero.

A todos GRACIAS…!!!

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN **21**

OBJETIVOS **24**

1. MARCO DE REFERENCIA **25**

1. 1 LIPASAS 25

1.1.1 Estructura y conformación de las lipasas 25

1.1.2 Mecanismo de activación de las lipasas 27

1.1.3 Adsorción de lipasas sobre estructuras hidrofóbicas 28

1.1.4 Propiedades biocatalíticas de lipasas microbianas 30

1.2 MODULACION DE LAS PROPIEDADES BIOCATALÍTICAS DE LIPASAS 31

Ingeniería del medio 32

Ingeniería del derivado 33

1.2.1 Modificación química en fase sólida 34

1.2.2 Insolubilización de proteínas mediante la síntesis de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) 41

1.3 USO DE LAS LIPASAS MICROBIANAS COMO BIOCATALIZADORES 47

1.3.1 Resolución cinética catalizada por lipasas 48

1.3.2 Enantioselectividad de las lipasas 50

1.3.3 Resolución cinética de R/S- Propanolol, catalizada por lipasas 53

1.5 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE DISTINTAS LIPASAS 54

Lipasa de *Candida antarctica B (Cal-B)* 54

Lipasa de *Thermomyces lanuginosus (TLL)* 55

2. MATERIALES Y MÉTODOS **56**

2.1 MATERIALES 56

2.2 MÉTODOS EXPERIMENTALES 56

2.2.1 Purificación del extracto crudo de las lipasas de *Candida Antarctica B (Cal-B) y Thermomyces Lanuginosus (TLL)*.....56

Adsorción interfacial de las enzimas (Cal-B y TLL) en soportes de octil agarosa.....56

Desorción de las enzimas (Cal-B y TLL) del soporte octil agarosa.....57

2.2.2 Estudio del efecto de la modificación química sobre las propiedades de las lipasas de *Candida Antarctica B (Cal-B) y Thermomyces lanuginosus (TLL)* inmovilizadas en soportes de octil agarosa 57

Aminación de lipasas inmovilizadas en soportes de octil agarosa.....58

Succinilación de lipasas inmovilizadas en soportes de octil agarosa.....58

2.2.2.1 Evaluación de la estabilidad de las lipasas inmovilizadas en octil agarosa sin modificar y modificadas por aminación y succinilación química.....59

Evaluación de la estabilidad térmica 59

Evaluación de la estabilidad frente a solventes orgánicos 59

2.2.3 Síntesis de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) de Cal-B y TLL 59

Selección de las mejores condiciones de precipitación 61

Síntesis de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) a partir de lipasas modificadas mediante reacciones de aminación.....62

Evaluación de la estabilidad térmica de los CLEAs de Cal-B y TLL.....62

2.2.5 Evaluación de la enantioselectividad de los agregados enzimáticos entrecruzados de CAL-B y TLL en la resolución cinética del R/S-Propanolol 62

2.3 METODOS ANALÍTICOS 64

2.3.1 Determinación de la actividad lipásica utilizando p-nitrofenilbutirato (p-NPB).....64

2.3.2 Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford.....64

2.3.3 Determinación de los grupos amino primarios libres en la lipasa....65

2.3.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida....65

Electroforesis SDS-PAGE (en condiciones desnaturalizantes)....65

Electroforesis PAGE-Nativa....66

2.3.5 Análisis por HPLC....67

Determinación del exceso enantiomérico (ee_s y ee_p) y la enantioselectividad (E)....67

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN....68

3.1 Purificación de lipasas microbianas de *Candida antarctica B (Cal-B) y Thermomyces lanuginosus (TLL)* por cromatografía de adsorción interfacial....68

3.2. Estudio del efecto de la modificación química en fase sólida por reacciones de aminación sobre las propiedades de la Cal-B y la TLL inmovilizadas en octil agarosa....72

3.2.1. Efecto de la modificación química por reacciones aminación sobre las propiedades de la Cal-B inmovilizada en soportes de octil agarosa....73

o *Caracterización electroforética de los derivados de Cal-B aminados inmovilizados en octil agarosa*....75

o *Efecto de la modificación química por reacciones de aminación, sobre la actividad hidrolítica frente al p-NPB de la Cal-B inmovilizada en soportes de octil agarosa*....77

o *Estudio del efecto de la modificación química por reacciones de aminación sobre la estabilidad térmica y frente a solventes orgánicos de la Cal-B inmovilizada en soportes de octil agarosa*....79

3.2.2. Efecto de la modificación química por reacciones aminación sobre las propiedades de la TLL inmovilizada en soportes de octil agarosa....84

o *Caracterización electroforética de los derivados de TLL aminados inmovilizados en octil agarosa*....86

o *Efecto de la modificación química por reacciones de aminación, sobre la actividad hidrolítica frente al p-NPB de la TLL inmovilizada en soportes de octil agarosa* 87

o *Estudio del efecto de la modificación química por reacciones de aminación sobre la estabilidad térmica y frente a solventes orgánicos de la TLL inmovilizada en soportes de octil agarosa* 89

3.2.3 Efecto de la modificación química por reacciones de aminación sobre la estabilidad de diferentes lipasas microbianas 92

3.3 Estudio del efecto de la modificación química en fase sólida por reacciones de succinilación sobre las propiedades de la Cal-B y la TLL inmovilizadas en octil agarosa 94

3.3.1. Efecto de la modificación química por reacciones succinilación sobre las propiedades de la Cal-B inmovilizada en soportes de octil agarosa 95

o *Caracterización electroforética de los derivados de Cal-B succinilados inmovilizados en octil agarosa* 96

o *Efecto de la modificación química por reacciones de succinilación, sobre la actividad hidrolítica frente al p-NPB de la Cal-B inmovilizada en soportes de octil agarosa* 97

o *Estudio del efecto de la modificación química por reacciones de succinilación sobre la estabilidad térmica y frente a solventes orgánicos de la Cal-B inmovilizada en soportes de octil agarosa*.....98

3.3.2. Efecto de la modificación química por reacciones succinilación sobre las propiedades de la TLL inmovilizada en soportes de octil agarosa 101

o *Caracterización electroforética de los derivados de TLL succinilados inmovilizados en octil agarosa* 102

o *Efecto de la modificación química por reacciones de succinilación, sobre la actividad hidrolítica frente al p-NPB de la TLL inmovilizada en soportes de octil agarosa*.....102

o *Estudio del efecto de la modificación química por reacciones de succinilación sobre la estabilidad térmica y frente a solventes orgánicos de la TLL inmovilizada en soportes de octil agarosa* 104

3.3.3 Efecto de la modificación química por reacciones de succinilación sobre la estabilidad de diferentes lipasas microbianas 107

3.4 Evaluación del efecto de la modificación química por reacciones de aminación en la síntesis de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) de la Cal-B y la TLL.....108

3.4.1 Síntesis de CLEAs de la lipasa de *Candida antarctica B* modificada por reacciones de aminación 111

- *Selección del agente precipitante para la Cal-B* 111
- ***Síntesis y caracterización del CLEA de Cal-B***.....112
- *Evaluación de la estabilidad térmica del CLEA de Cal-B*.....113

3.4.2 Síntesis de CLEAs de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* modificada por reacciones de aminación 114

- *Selección del agente precipitante para la TLL* 114
- *Síntesis y caracterización del CLEA de TLL* 116
- *Evaluación de la estabilidad térmica del CLEA de TLL*.....116

3.5 Evaluación de la enantioselectividad de los agregados enzimáticos entrecruzados de Cal-B y TLL en la resolución cinética del R/S-Propanolol.....118

4. CONCLUSIONES 121

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....123

ANEXOS.....132

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de la lipasa de Humícola lanuginosus. En la que se muestra la hoja β (azul), rodeada por algunas hélices (amarillo). El lid o tapadera se muestra en rojo. 27
Figura 2. Mecanismo de activación interfacial de las lipasas. 28
Figura 3. Adsorción de lipasas sobre diferentes estructuras hidrofóbicas. 29
Figura 4. Equilibrio conformacional de lipasas microbianas en medios acuosos homogéneos. 31
Figura 5. Efecto de las condiciones experimentales en el mecanismo de apertura y cierre de la lipasa. 33
Figura 6. Reacción de aminación con etilendiamina de los grupos carboxílicos de la superficie de la proteína 36
Figura 7. Reacción de succinilación con anhídrido succínico de los grupos amino de la superficie de la proteína 37
Figura 8. Actividad hidrolítica de las diferentes preparaciones de Novozymes-435 en la hidrólisis de tres diferentes sustratos. Figura tomada de Cabrera et al; 2009 39
Figura 9. Mecanismo de inmovilización de enzimas sobre soportes glioxil-agarosa.....41
Figura 10. Método de entrecruzamiento de agregados enzimáticos.....43
Figura 11. Síntesis de agregados enzimáticos entrecruzados sobre los poros de sílica gel modificada. Figura tomada de Wang et al; 2010. 45
Figura 12. Hidrólisis enzimática selectiva de diésteres dicarboxílicos fenilmalónico 47
Figura 13. Resolución cinética catalizada por lipasas para un sistema reversible. La resolución ocurre cuando k_1 es diferente de k_3, tal que entre mayor sea la diferencia una, mayor resolución es obtenida. 49

Figura 14. Estructura del R/S-propanolol, molécula antagonista de los receptores β-adrenérgicos 54
Figura 15. Procedimiento para la síntesis de agregados enzimáticos entrecruzados CLEAs 60
Figura 16. Resolución cinética del R/S-propanolol catalizada por agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) de Cal-B y TLL 63
Figura 17. Reacción de hidrólisis del p-nitrofenilbutirato (p-NPB) catalizada por lipasas microbianas 64
Figura 18. Electroforesis SDS-PAGE del extracto crudo y purificado de la Cal-B. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Extracto crudo de Cal-B. Carril 3: Sobrenadante del curso de inmovilización. Carril 4: Cal-B adsorbida en octil agarosa 69
Figura 19. Electroforesis SDS-PAGE del extracto crudo y purificado de TLL. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Extracto crudo de TLL. Carril 3: Sobrenadante del curso de inmovilización. Carril 4: TLL adsorbida en soportes de octil agarosa. 70
Figura 20. Curso de inmovilización de la Cal-B sobre soportes de octil agarosa. La actividad en la suspensión y el sobrenadante fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4 mM) a pH 7, 25 mM y 25ºC. 71
Figura 21. Curso de inmovilización de la TLL sobre soportes de octil agarosa. La actividad en la suspensión y el sobrenadante fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4 mM) a pH 7, 25mM y 25ºC. 71
Figura 22. Estructura tridimensional de la lipasa de Candida antarctica B (Estructura 3D obtenida de la base de datos PDB. Software visualizador utilizado PYMOL viewer versión 0.99. El código de PDB 1TCA.Codigo de colores: centro activo (azul), lid o tapadera (amarillo), acido aspártico (verde), ácido glutámico (violeta), tirosina (naranja). 75

Figura 23. (a) Electroforesis SDS-PAGE y PAGE-Nativa (b) de los derivados modificados de Cal-B. Carril M: Marcador de peso molecular, Carril 1: CalB-octil no modificada, Carril 2: CalB-A-10%, Carril 3: CalB-A-50%, Carril 4: CalB-A-100%, Carril 5: CalB-H-10%, Carril 6: CalB-H-50%, Carril 7: CalB-H-100% 76

Figura 24. Curso de inactivación térmica a 70ºC de los derivados modificados y sin modificar de la lipasa de Cal-B. La actividad enzimática fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4mM) en buffer fosfato pH7, 25mM a 25 ºC......80

Figura 25. Curso de inactivación en presencia de solvente orgánico (THF 50%(v/v)) de los derivados modificados y sin modificar de la lipasa de Cal-B. La actividad fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4mM) en buffer fosfato pH7, 25mM a 25 ºC. 83

Figura 26. Estructura tridimensional de la lipasa de Thermomyces lanuginosus (Estructura 3D obtenida de la base de datos PDB. Software visualizador utilizado PYMOL viewer versión 0.99. El código de PDB 1DTE. Codigo de colores: centro activo (azul), lid o tapadera (Naranja), acido aspártico (gris oscuro), ácido glutámico (rojo), tirosina (rosado). 85

Figura 27. (a) Electroforesis SDS-PAGE y PAGE-Nativa (b) de los derivados modificados de TLL. Carril M: Marcador de peso molecular, Carril 1: TLL no modificada, Carril 2: TLL-A-10%, Carril 3: TLL-H-10%, Carril 4: TLL-A-50%, Carril 5: TLL-H-50%, Carril 6: TLL-A-100, Carril 7: TLL-H-100%.....86

Figura 28. Curso de inactivación térmica a 70ºC de los derivados modificados y sin modificar de la TLL. La actividad fue determinada frente a la hidrólisis del p-NPB (0.4mM) en buffer fosfato pH7, 25mM a 25 ºC......89

Figura 29. Curso de inactivación en presencia de solvente orgánico (THF) de los derivados modificados y sin modificar de la lipasa de TLL.

La actividad fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4mM) en buffer fosfato pH7, 25mM a 25 ºC. 91
Figura 30. Estructura tridimensional de la lipasa de Candida antarctica B (Estructura 3D obtenida de la base de datos PDB. Software visualizador utilizado PYMOL viewer versión 0.99. El código de PDB 1TCA. Código de colores: centro activo (azul), lid o tapadera (amarillo), residuos de lisina (aguamarina). 95
Figura 31. (a) Electroforesis SDS-PAGE y PAGE-Nativa (b) de los derivados modificados de Cal-B. Carril M: Marcador de peso molecular, Carril 1: CalB-Octil no modificada, Carril 2: CalB-S-10%, Carril 3: CalB-S-50%, Carril 4: CalB-S-100% 97
Figura 32. Curso de inactivación térmica a 70ºC de los derivados modificados y sin modificar de la Cal-B. La actividad fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4mM) en buffer fosfato pH 7, 25mM a 25 ºC. 99
Figura 33. Curso de inactivación en presencia de solvente orgánico (THF) de los derivados modificados y sin modificar de la Cal-B. La actividad fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4mM) en buffer fosfato pH7, 25mM a 25 ºC. 100
Figura 34. Estructura tridimensional de la lipasa de Thermomyces lanuginosus (Estructura 3D obtenida de la base de datos PDB. Software visualizador utilizado PYMOL viewer versión 0.99. El código de PDB 1DTE. Código de colores: centro activo (azul), lid o tapadera (naranja), residuos de lisina (verde azulado). 101
Figura 35. (a) Electroforesis SDS-PAGE y PAGE-Nativa (b) de los derivados modificados de TLL. Carril M: Marcador de peso molecular, Carril 1: Octil-TLL no modificada, Carril 2: TLL-S-10%, Carril 3: TLL-S-50%, Carril 4: TLL-S-100% 102

Figura 36. Curso de inactivación térmica a 70ºC de los derivados modificados y sin modificar de la TLL. La actividad fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4mM) en buffer fosfato pH7, 25mM a 25 ºC. 105
Figura 37. Curso de inactivación en presencia de solvente orgánico (THF) de los derivados modificados y sin modificar de la TLL. La actividad fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4mM) en buffer fosfato pH7, 25mM a 25 ºC. 106
Figura 38. Esquema general de la obtención de la lipasa modificada por reacciones de aminación para la formación de agregados enzimáticos entrecruzados CLEAs. 109
Figura 39. Electroforesis SDS-PAGE. Carril M: Marcador de peso molecular; Carril 1: enzima soluble; Carril 2: Cal-B-Octil; Carril 3: CLEA-CalB 113
Figura 40. Curso de inactivación térmica a 70ºC de los derivados de Cal-B en octil agarosa y del CLEA-CalB. La actividad fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4mM) en buffer fosfato pH7, 25mM a 25 ºC. 114
Figura 41. Electroforesis SDS-PAGE. Carril M: Marcador de peso molecular; Carril 1: enzima soluble; Carril 2: TLL-Octil; Carril 3: CLEA-TLL.....116
Figura 42. Curso de inactivación térmica a 70ºC de los derivados de TLL en octil agarosa y del CLEA-TLL. La actividad fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4mM) en buffer fosfato pH7, 25mM a 25 ºC. 117

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Selección del mejor agente precipitante para la lipasa de Candida antarctica B (Cal-B) 61

Tabla 2. Selección del mejor agente precipitante para la lipasa de Thermomyces lanuginosus (TLL).....61

Tabla 3. *Efecto de la concentración de carbodiimida sobre el grado de modificación de la Cal-B y TLL por reacciones de aminación química. Condiciones de modificación: EDA 1M, pH 4.75.*.....73

Tabla 4. Actividad enzimática de los derivados de Cal-B modificados por reacciones de aminación. Condiciones de ensayo: La actividad fue determinada usando como sustrato p-NPB 0,4mM en buffer fosfato pH 7, 25mM a 25ºC 78

Tabla 5. Actividad enzimática de los derivados de TLL modificados por reacciones de aminación. Condiciones de ensayo: La actividad enzimática fue determinada usando como sustrato p-NPB 0,4mM en buffer fosfato pH 7, 25mM a 25ºC.....87

Tabla 6. Efecto de la aminación sobre el tiempo de vida media, de los diferentes derivados de Cal-B y TLL inmovilizados en soportes de octil agarosa bajo diferentes condiciones de inactivación 92

Tabla 7*. Efecto de la concentración de anhídrido succínico sobre el grado de modificación de la Cal-B y TLL por reacciones de succinilación química. Condiciones de modificación: buffer fosfato 50mM, pH 8.*.....95

Tabla 8. Actividad enzimática de los derivados de Cal-B modificados por reacciones de succinilación. Condiciones de ensayo: La actividad enzimática fue determinada usando como sustrato p-NPB 0,4mM en buffer fosfato pH 7, 25mM a 25ºC.....98

Tabla 9. Actividad enzimática de los derivados de TLL modificados por reacciones de succinilación. Condiciones de ensayo: La actividad enzimática fue determinada usando como sustrato p-NPB 0.4mM, buffer fosfato pH 7 25mM a 25ºC.....103
Tabla 10. Efecto de la succinilación sobre el tiempo de vida media de los diferentes derivados de Cal-B y TLL inmovilizados en soportes de octil agarosa, bajo diferentes condiciones de inactivación.....107
Tabla 11. Efecto del tipo de agente precipitante sobre la actividad enzimática de la Cal-B precipitada. La actividad fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4mM) en buffer fosfato pH 7, 25mM a 25 ºC......111
Tabla 12. Efecto del tipo de agente precipitante sobre la actividad enzimática de la TLL precipitada. La actividad fue determinada usando como sustrato p-NPB (0,4mM) en buffer fosfato pH7, 25mM a 25 ºC......115
Tabla 13. Exceso enantiomérico (ee), enantioselectividad (E) de los agregados enzimáticos entrecruzados de Cal-B y TLL, evaluada en la resolución cinética del R/S-Propanolol. 119

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Curva de calibración. Método de Bradford…….....132

Anexo B. Determinación de la actividad catalítica…..……..……..133

Anexo C. Curva de calibración de la mezcla R/S- Propanolol…..……134

TÍTULO: **MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOCATALÍTICAS DE LIPASAS MICROBIANAS MEDIANTE LA SÍNTESIS DE AGREGADOS ENZIMÁTICOS ENTRECRUZADOS (CLEAs)*.**

Galvis Magaly, Ortiz Claudia y Torres Rodrigo **

Palabras claves: Modificación química, agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs).

Las lipasas de *Cándida antarctica B* (Cal-B) y *Thermomyces lanuginosus* (TLL) fueron inmovilizadas en soportes de octil agarosa y posteriormente modificadas por reacciones de aminación y succinilación en fase sólida. El efecto de la modificación química fue evaluado sobre las propiedades de actividad y estabilidad de la Cal-B y la TLL, hallándose que la aminación química permitió un incremento del 10 y 13% en la actividad de la Cal-B y la TLL, respectivamente. La aminación química mejoró notablemente la estabilidad de la TLL en la medida que el grado de modificación fue incrementado. Sin embargo, este tipo de modificación causó un efecto irrelevante sobre la propiedad de estabilidad de la Cal-B. Por su parte, la succinilación química provocó una marcada reducción en la actividad de las lipasas en estudio.

Las lipasas modificadas por reacciones de aminación, fueron utilizadas para la preparación de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs). La síntesis de CLEAs ocurre a través de dos pasos: un paso de precipitación seguido de un paso de entrecruzamiento. Aunque la precipitación puede alcanzarse mediante el uso de diferentes agentes precipitantes, el paso de entrecruzamiento se ha convertido en un problema debido a la baja cantidad de residuos de Lys presentes en la superficie de las lipasas. El enriquecimiento con grupos amino mediante reacciones de aminación con etilendiamina facilitó el entrecruzamiento proteico, dando lugar a dos nuevos biocatalizadores que fueron finalmente utilizados en la resolución cinética del R/S-Propanolol.

_____

*Proyecto de Grado

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

TITLE: **MODULATION OF BIOCATALYTIC FEATURES OF MICROBIAL LIPASES BY SYNTHESIS CROSSLINKED ENZYME AGGREGATES (CLEAs)*.**

Galvis Magaly, Ortiz Claudia y Torres Rodrigo **

Keywords: Chemical modification, Crosslinked enzyme aggregates (CLEAs).

Candida antarctica lipase B (CAL-B) and *Thermomyces lanuginosus* (TLL) were immobilized on octil agarose and further modified on solid phase by succinylation and amination reactions. The effect of chemical modification on the activity and stability properties of the Cal-B and TLL was evaluated and found to chemical amination allowed an increase of 10% and 13% in the Cal-B and TLL activity, respectively. The chemical amination markedly improved stability TLL as in the degree of modification was increased. However, this type of modification caused an irrelevant effect on the stability property of the Cal-B. Otherwise, the chemical succinylation caused a marked reduction in the activity of lipases on study.

Lipases modified by amination reactions were used for the preparation of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). CLEAs synthesis occurs through two steps: precipitation step followed by a crosslinking. Although the precipitation can be achieved by using different precipitating agents, the crosslinking step has become a problem due to the low amount of Lys residues present on the surface of lipases. The enrichment with amino groups by chemical amination with ethylenediamine facilitated protein crosslinking, resulting in two new biocatalysts that were ultimately used in the kinetic resolution of R / S-propranolol.

_____

*Gradution Project

**Faculty of science. School of chemistry. Director: Rodrigo Torres Sáez

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son proteínas que catalizan una gran variedad de reacciones de transformación de sustratos orgánicos naturales y sintéticos. Poseen una elevada especificidad, regioselectividad y enantioselectividad, lo cual las convierte en catalizadores ideales para llevar a cabo reacciones en biosíntesis orgánica. Sin embargo, las enzimas en general, poseen limitaciones como baja estabilidad en condiciones drásticas de pH y temperatura, y pueden presentar pérdida de sus propiedades catalíticas al ser empleadas en medios de reacción diferentes a los naturales, por lo que su implementación a nivel industrial es restringida (Rozzell, 1999).

Por esta razón, la ingeniería de enzimas ha desarrollado a lo largo de los últimos años, nuevas técnicas que pretenden mejorar las propiedades biocatalíticas (estabilidad, actividad, enantioselectividad) de las enzimas. Entre las técnicas más utilizadas se encuentran la inmovilización sobre soportes o en ausencia de soportes, técnicas de modificación química y manipulación genética, entre otras. De esta manera, las enzimas pueden ser finalmente utilizadas a nivel industrial.

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas, EC. 3.1.1.3) conforman un grupo de enzimas de gran interés en química orgánica, porque catalizan reacciones con diferentes sustratos con una elevada regio y/o enantioespecificidad y/o selectividad. Estas propiedades han convertido a las lipasas en las enzimas con mayor uso en biotransformaciones (Cruz *et al;* 2012; Gotor *et al;* 2006).

Las lipasas presentan un complejo mecanismo de activación interfacial, que implica cambios conformacionales entre una forma abierta (activa) y una forma cerrada (inactiva) de la molécula enzimática. La complejidad de este interesante mecanismo de activación genera grandes dificultades en el entendimiento y control de la aplicación de las lipasas. Sin embargo, puede convertirse en una interesante herramienta que permita la modulación de las propiedades biocatalíticas de estas enzimas (Fernández *et al*; 1998; Bastida *et al*., 1998)

La inmovilización de proteínas y la modificación química han sido herramientas ampliamente utilizadas en la modulación de las propiedades las lipasas. En muchos casos, la inmovilización constituye un requerimiento esencial en el uso de enzimas a nivel industrial, que facilita el control de la reacción al permitir una fácil separación y reutilización del biocatalizador (Rodrigues *et al*; 2011).

A diferencia de la inmovilización, el cual es un paso necesario en la preparación de un biocatalizador industrial, la modificación química es considerada un paso adicional en la preparación de nuevos biocatalizadores, que podría mejorar las propiedades de las enzimas. De esta manera, la modificación parcial o completa de los residuos aminoacídicos más abundantes en la superficie de la proteína (por ej, Asp, Glu, Lys) alteraría en gran medida sus propiedades. Por ejemplo, la aminación de los grupos carboxílicos de una enzima con etilendiamina, cambiará los grupos cargados negativamente, por nuevos grupos que a pH neutro presentan carga positiva, generando fuerzas de repulsión en los sitios donde existían puentes iónicos y dando lugar otras nuevas interacciones (Rodrigues *et al*; 2011).

La modificación química y la inmovilización de proteínas han sido tradicionalmente utilizadas como herramientas no relacionadas, que pretenden mejorar las propiedades catalíticas de las enzimas. Sin embargo, en algunos casos sus efectos positivos pueden ser aditivos, dando lugar a un biocatalizador con propiedades mejoradas (Orzáez *et al;* 2007).

Durante esta investigación se estudió el efecto de la modificación química, utilizando reacciones de aminación y succinilación, sobre las propiedades de actividad y estabilidad de las lipasas microbianas de *Candida antarctica B (Cal-B) y Thermomyces lanuginosus (TLL),* previamente inmovilizadas sobre soportes de octil agarosa.

Finalmente, fueron preparados agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) de Cal-B y TLL, aprovechando los beneficios de la modificación química por reacciones de aminación, la cual provee a la enzima de nuevos grupos amino altamente reactivos. El uso en conjunto de las estrategias de modificación química y síntesis de agregados enzimáticos entrecruzados, dio lugar a dos nuevos biocatalizadores que fueron finalmente utilizados en la resolución cinética de mezclas racémicas, con interés farmacéutico como el R/S-Propanolol.

OBJETIVOS

General

Modular las propiedades biocatalíticas de las lipasas de *Candida antarctica B (Cal-B) y Thermomyces lanuginosus (TLL),* mediante estrategias de modificación química y síntesis de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs)

Específicos

- Evaluar el efecto de la modificación química por reacciones de aminación y succinilación, sobre las propiedades biocatalíticas de las lipasas de *Candida antarctica B (Cal-B) y Thermomyces lanuginosus (TLL)*, previamente inmovilizadas en soportes de octil agarosa

- Evaluar el efecto de la modificación química por reacciones de aminación en la síntesis de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) de las lipasas microbianas de *Candida antarctica B (Cal-B) y Thermomyces lanuginosus (TLL)*

- Determinar la enantioselectividad de los agregados enzimáticos entrecruzados preparados a partir de enzimas modificadas por reacciones de aminación, en la resolución cinética del R/S-propanolol

1. MARCO DE REFERENCIA

1. 1 LIPASAS

Las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas EC 3.1.1.3) conforman un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza. Suelen encontrarse en diversos organismos, desde microorganismos hasta plantas y animales. Las lipasas conforman un grupo de enzimas útiles en reacciones que involucran ésteres insolubles en agua (Reetz, M; 2002).

Las principales reacciones catalizadas por lipasas pueden clasificarse en dos grandes categorías: hidrólisis y síntesis. Dentro de ésta última se clasifican las reacciones esterificación y transesterificación (Reis *et al*; 2009). A continuación se presentan las reacciones de hidrólisis y síntesis catalizadas por lipasas:

Hidrólisis

$RCOOR' + H_2O \rightarrow RCOOH + R'OH$

Síntesis

- Esterificación

$RCOOH + R'OH \rightarrow RCOOR' + H_2$

- Transesterificación

$RCOOR' + R''OH \rightarrow RCOOR'' + R'OH$

1.1.1 Estructura y conformación de las lipasas

Las lipasas están clasificadas como serina-hidrolasas. Su triada catalítica está compuesta por residuos aminoácidos de serina (Ser),

histidina (His), ácido aspártico (Asp) o glutámico (Glu), triada catalítica que también se encuentra en las serina-proteasas.

En general la estructura de las lipasas puede describirse como una hoja β central, con un centro catalítico donde se encuentra la serina y sobre éste residuo aminoacídico, un gran bolsillo hidrofóbico el cual está formado por residuos aminoacídicos de fenilalanina, triptófano, isoleucina, leucina y tirosina. Esta amplia zona de contacto hidrofóbico se muestra después de la activación de la enzima a medida que es desplazado, un segmento helicoidal de la cadena polipeptíca llamado lid o “tapadera” que cubre el sitio activo. De manera que el desplazamiento del lid o tapadera, incrementa esta importante zona de contacto hidrofóbico. La localización del lid, longitud y complejidad, es característica de cada lipasa y se incrementa con el tamaño de la molécula (Grochulsky *et al;* 1993; Allan, 2000).

En la figura 1 se observa la estructura general de una lipasa, en la que el lid ha sido desplazado, dejando disponible el centro activo y dando lugar a una conformación abierta de la lipasa. Debido a que lid se encuentra ubicado en la vecindad del centro activo, su naturaleza y disposición define en gran parte el mecanismo de activación de las lipasas.

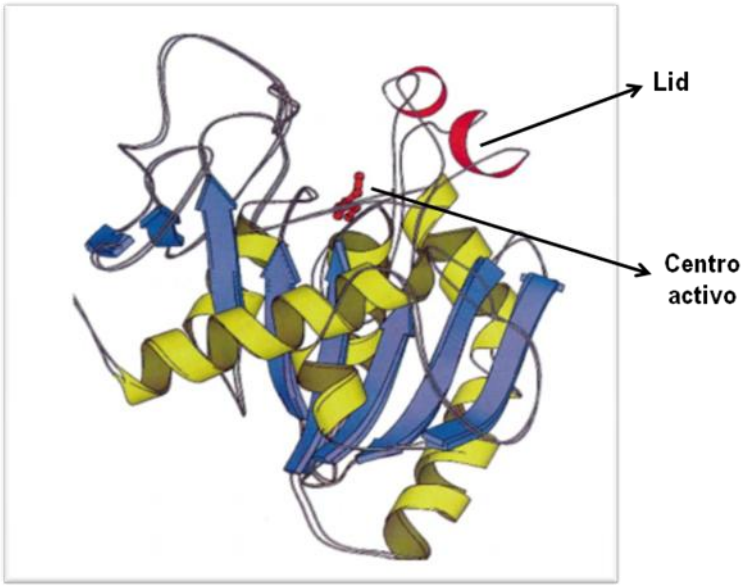


***Figura 1**. Estructura general de la lipasa de Humícola lanuginosus. En la que se muestra la hoja β (azul), rodeada por algunas hélices (amarillo). El lid o tapadera se muestra en rojo.*

1.1.2 Mecanismo de activación de las lipasas

Estudios realizados por mecánica molecular y por Rayos-X sobre la estructura de la lipasa de *Rhizomucor miehei* han comprobado la existencia de la tapadera hidrófoba o lid, constituida por un segmento helicoidal de la cadena proteica, que cubre el centro activo de la lipasa y que tras la adsorción de la enzima a una interfase oleo-acuosa, se abre, dejando libre acceso del sustrato hasta el centro activo de la enzima, donde se sitúa la triada catalítica y el agujero oxianiónico. Este fenómeno es conocido como *"activación interfacial"* de las lipasas. Lo anterior sugiere que las lipasas, que son enzimas hidrosolubles, sufren un cambio conformacional en el momento de su fijación a una interfase (Palomo, J; 2003).

En la figura 2 se observa que con el desplazamiento del lid, ocurre un rearreglo estructural de la lipasa, que deja libre el centro activo y un gran número de residuos hidrofóbicos expuestos, creando una gran área hidrofóbica para la interacción con la interfase y el enlace del sustrato al centro activo (Grochulsky *et al;* 1993). Sin embargo, se ha observado que en ausencia de interfases hidrofóbicas, es decir en medios acuosos homogéneos, las lipasas presentan actividad catalítica, lo que sugiere que éstas se encuentran en equilibrio conformacional entre sus dos estructuras, abierta o activa y cerrada o inactiva (Brzozowski *et al*; 1991)

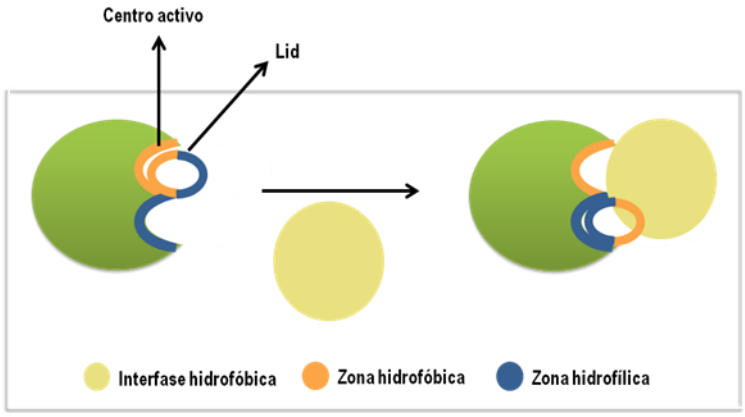


Figura 2. *Mecanismo de activación interfacial de las lipasas.*

1.1.3 Adsorción de lipasas sobre estructuras hidrofóbicas

El mecanismo de activación interfacial de las lipasas indica que éstas presentan una gran afinidad por las superficies hidrofóbicas. La conformación abierta de la lipasa da lugar a un gran bolsillo hidrofóbico formado por la cara interna del lid y los residuos hidrofóbicos expuestos que rodean el centro activo. De esta manera, según se observa en la figura 3, las lipasas pueden reconocer cualquier tipo de superficie

hidrofóbica: gotas de grasa, soportes hidrofóbicos u otras proteínas (Derewenda, 1992).

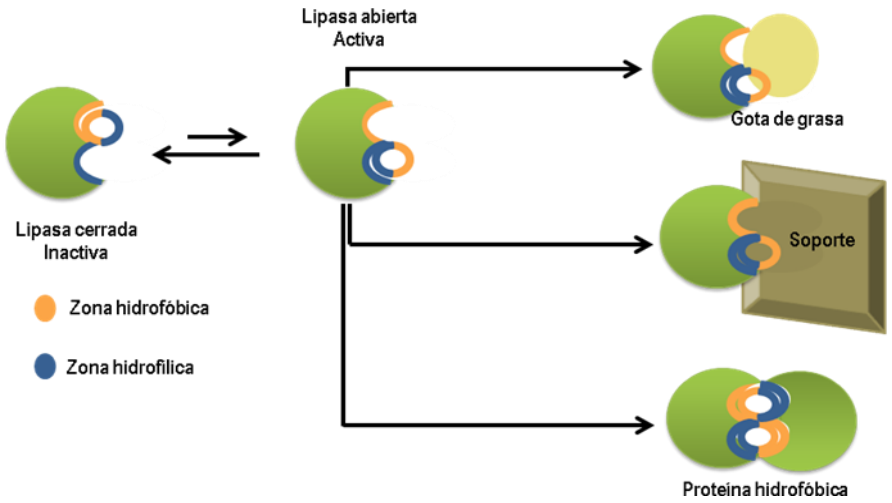


Figura 3. *Adsorción de lipasas sobre diferentes estructuras hidrofóbicas.*

La gran afinidad de las lipasas por superficies hidrofóbicas, ha sido usada como una herramienta útil de inmovilización y purificación de este tipo de enzimas (Fernandez *et al*; 1998)

Frecuentemente los extractos crudos de lipasas incluyen otras proteínas y enzimas como las esterasas. También la actividad lipásica puede estar dada por la adición de muchas formas activas de la lipasa, lo que puede alterar el comportamiento catalítico de la enzima de interés y por tanto su utilidad como biocatalizador en muchas reacciones de química fina (Segura *et al*; 2006).

En este sentido, la inmovilización por adsorción interfacial ha sido utilizada para la purificación de lipasas a partir de diferentes extractos enzimáticos. Sugira e Isobe (1997) purificaron las enzimas de *Chromobacterium y Pseudomonas* mediante su inmovilización a baja

fuerza iónica sobre vidrios recubiertos hidrofóbicamente. En 1994 Rua y Ballesteros purificaron la lipasa de *Candida rugosa* mediante adsorción en soportes hidrofóbicos de fenil agarosa. La purificación de estas enzimas fue posible gracias a la afinidad de las lipasas por las superficies hidrofóbicas (Fernández *et al;* 1998).

La adsorción interfacial de las lipasas sobre estructuras hidrofóbicas también ha sido utilizada como una novedosa técnica de inmovilización, aplicable a muchas lipasas. Las lipasas son inmovilizadas a una superficie a través de interacciones hidrofóbicas, electrostáticas o fuerzas de van der Waals. La adsorción de lipasas sobre superficies altamente hidrofóbicas involucra principalmente la zona que rodea su sitio catalítico, zona que comprende el gran bolsillo hidrofóbico formado por la apertura del lid. La inmovilización de las lipasas sobre soportes hidrofóbicos de octil agarosa puede promover un incremento en la actividad de la enzima, o en otros casos mantenerla. Este efecto de hiperactivación sugiere que la enzima adopta una conformación tal en la que el sitio catalítico se encuentra totalmente dispuesto para la acomodación de un determinado sustrato (Fernandez *et al*; 1998).

1.1.4 Propiedades biocatalíticas de lipasas microbianas

Un catalizador se define como toda aquella sustancia que acelera la velocidad de una reacción y puede ser finalmente recuperado, sin sufrir cambios químicos. En los organismos vivos las enzimas actúan como catalizadores de la mayoría de las reacciones biológicas. Actualmente las enzimas también se utilizan como catalizadores de reacciones en síntesis química. Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada vez más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a catalizadores convencionales no biológicos: presentan una gran

actividad catalítica, muestran una gran preferencia de sustrato y son muy activos en condiciones suaves de pH y temperatura (Arroyo, 1998).

Las lipasas se han convertido en las enzimas con mayor uso en biotransformaciones ya que presentan propiedades que las hacen biocatalizadores útiles: poseen una amplia especificidad por sustratos muy diferentes, elevada regioselectividad y enantioselectividad (Palomo *et al;* 2002). Esta última propiedad les permite llevar a cabo transformaciones regio y enantioselectivas, las cuales favorecen la preparación de alcoholes y ésteres ópticamente puros.

1.2 MODULACION DE LAS PROPIEDADES BIOCATALÍTICAS DE LIPASAS

Como se mencionó anteriormente y según se muestra en la figura 4, en medios acuosos homogéneos, las lipasas se encuentran en equilibrio conformacional, entre su estructura cerrada o inactiva y su estructura abierta o activa, lo que permite que sean catalíticamente activas en ausencia de interfases hidrofóbicas.

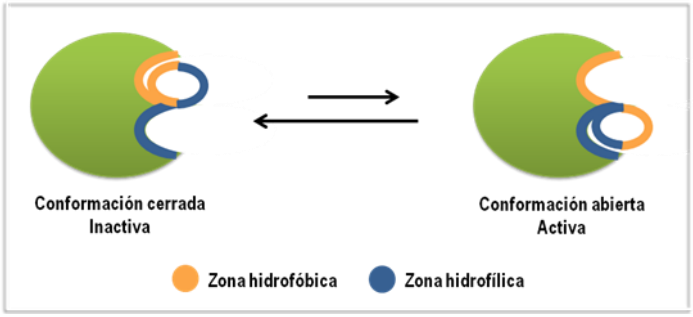


Figura 4. *Equilibrio conformacional de lipasas microbianas en medios acuosos homogéneos.*

Durante la catálisis enzimática, las lipasas sufren cambios conformacionales dramáticos, que alteran el equilibrio conformacional

en el que éstas se encuentran. De acuerdo con lo anterior, los grandes cambios conformacionales que sufren las lipasas y el gran número de fuerzas implicadas en el mantenimiento de la estructura de las diferentes conformaciones, el centro activo de la lipasa parece ser fácilmente alterable, con lo que se podría conseguir modular las propiedades de la enzima (Bastida *et al;* 1998). Para ello se puede hacer uso de dos diferentes herramientas: la ingeniería del medio de reacción y la ingeniería del derivado.

Ingeniería del medio

El término ingeniería del medio refiere a la posibilidad de influir en las propiedades de la enzima en la medida que las condiciones del medio son modificadas. En el año 2000, Carrea y colaboradores mostraron que la actividad enzimática en solventes orgánicos depende dramáticamente de las condiciones del medio, al evaluar parámetros como la actividad acuosa, el grado de acidez o basicidad, y la naturaleza del solvente orgánico (Carrea *et al*; 2000).

La influencia de las condiciones ambientales de reacción sobre las propiedades de la enzima puede ser consecuencia del complejo mecanismo de acción (activación interfacial), que involucra significativos cambios conformacionales en la estructura de la enzima (Derewenda *et al;* 1992; Brzozowski *et al;* 1991).

La figura 5 representa el gran número de interacciones que intervienen en el mantenimiento de la conformación abierta de la lipasa: interacciones hidrofóbicas entre el gran bolsillo hidrofóbico con un sustrato o con el medio de reacción, e interacciones electrostáticas y del tipo puente de hidrógeno entre la cara externa del lid y el resto de la proteína. En este sentido, es posible considerar que cualquier cambio

en las condiciones del medio (solventes, pH, fuerza iónica) puede alterar de forma significativa el balance de éstas interacciones y por tanto afectar el equilibrio conformacional entre la estructura abierta y cerrada de la lipasa, la forma exacta del centro activo y por tanto sus propiedades catalíticas (Palomo *et al*; 2002; Palomo *et al;* 2004).

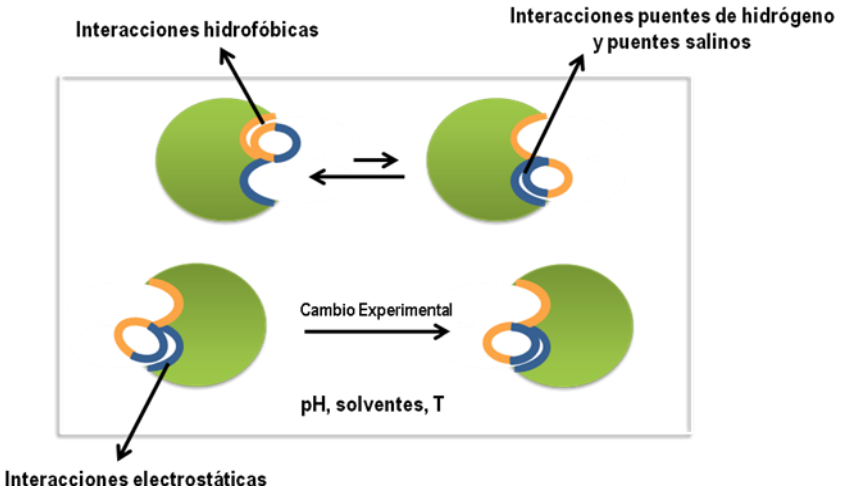


Figura 5. *Efecto de las condiciones experimentales en el mecanismo de apertura y cierre de la lipasa.*

Ingeniería del derivado

De acuerdo con los grandes cambios conformacionales que implican la apertura y cierre del lid en las lipasas, el hecho de preparar nuevos derivados enzimáticos implicando zonas más o menos cercanas al centro activo, confiriendo más o menos rigidez o alterando el microambiente de la enzima, podría también modificar en gran medida las propiedades catalíticas de las lipasas.

En este contexto, se han utilizado diferentes herramientas para la modificación de las propiedades de las lipasas. Estrategias como la inmovilización covalente multipuntual y unipuntual, la modificación

química y genética, han sido empleadas con el objetivo de modificar las propiedades biocatalíticas de las enzimas (López *et al;* 2005; Siddiqui y Cavicchioli, 2005).

En el curso de esta investigación se hizo uso de dos importantes estrategias: la primera de ellas fue la modificación química en fase sólida mediante reacciones de aminación y succinilación, y en segundo lugar la insolubilización de las proteínas mediante la síntesis de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs).

1.2.1 Modificación química en fase sólida

Si bien la adsorción de las lipasas sobre estructuras hidrofóbicas, permite que éstas, se encuentren mayoritariamente en su conformación abierta o activa. Bajo estas condiciones se modificó la superficie de las lipasas previamente inmovilizadas en soportes hidrofóbicos de octil agarosa. La modificación de proteínas en fase sólida permite efectuar un diseño sencillo de los experimentos debido a que:

- se facilita el control de la modificación, ya que el agente modificante que no ha reaccionado se encuentra en la disolución y se puede analizar sin interferencias de la proteína o del reactivo que ya ha reaccionado con ésta.

- el final de la reacción se consigue por simple filtrado del derivado, separándose de este modo todo el reactivo de la proteína insolubilizada y modificada.

- la protección de grupos importantes favorece la estabilidad de la enzima.

- se pueden diseñar fácilmente modificaciones químicas complejas con cambio de pH, eliminación de reactivos solubles, etc.

De acuerdo con lo anterior, la adsorción de las lipasas sobre una fase, facilita el control de las reacciones de modificación química (Penzol, 1996; Orzáez *et al;* 2007).

Por otra parte, las lipasas, así como otras enzimas no son catalizadores químicos perfectos. Pueden ser inestables bajo las condiciones del medio de reacción, o presentar baja o nula actividad y/o estabilidad bajo determinadas condiciones. En este sentido, la inmovilización junto con el uso de otras herramientas pueden mejorar las propiedades de las lipasas. De esta manera, la obtención de un biocatalizador industrial requiere inicialmente de un paso de inmovilización, de manera que la modificación química consiste entonces, en un paso adicional.

La modificación química ofrece una manera rápida y sencilla de obtener biocatalizadores mejorados, evitando los requerimientos de la modificación genética. La modificación química es una técnica rápida que requiere de cortos tiempo de reacción, haciendo que en pocas horas se puede obtener una amplia biblioteca de enzimas químicamente modificadas. No requiere el conocimiento previo de la estructura de la enzima ni la disponibilidad de los genes, ya que éste tipo de modificación solo incluye los grupos reactivos en la superficie de la enzima. Por otra parte, algunas desventajas son atribuidas a la modificación química. Por ejemplo, ésta requiere ser realizada cada vez que el biocatalizador es preparado, y no permite una modificación sitio-dirigida, de manera que es difícil modificar solo un tipo específico de aminoácidos. (Davis, 2003; Diaz *et al;* 2011).

La modificación de los residuos aminoacídicos externos en las proteínas (Lys, Asp, Glu) puede alterar en gran medida sus propiedades. Por ejemplo, la *aminación* de los grupos carboxílicos con

etilendiamina cambiará grupos cargados negativamente por grupos con carga positiva a pH neutro, con la consecuente generación de nuevas interacciones en la superficie de la proteína. Asimismo, la reactividad de la enzima modificada se hará completamente diferente, de manera que la modificación química permitirá la modulación de las propiedades de las enzimas (Rodrigues *et al;* 2011).

Durante el curso de ésta investigación se modificó la superficie de las Cal-B y la TLL mediante reacciones de aminación y succinilación, haciendo uso de dos agentes modificantes: etilendiamina y anhídrido succínico, respectivamente. Las reacciones de *aminación* requieren de la activación previa con carbodiimida de los grupos carboxílicos presentes en la superficie de la proteína. Una vez formado el intermediario, el agente modificador, la etilendiamina, actúa como un nucleófilo formando un nuevo enlace amida y confiriendo una densidad de carga diferente a la proteína. El mecanismo de reacción se muestra en la figura 6 (Alcalde, 1999; López *et al;* 2005; Hoare y Koshland, 1967).

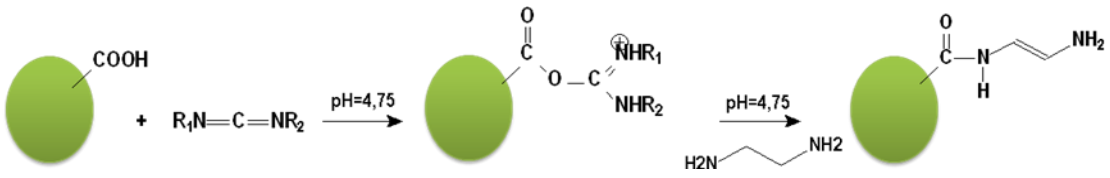


Figura 6. *Reacción de aminación con etilendiamina de los grupos carboxílicos de la superficie de la proteína*

En el proceso de modificación química por reacciones de aminación, es altamente probable que los residuos aminoacídicos de tirosina también sean alterados. Este tipo de aminoácidos tienden a generar O-aril-

isoureas mediante la interacción del grupo hidroxilo de la tirosina y el doble enlace de la carbodiimida, que actúa como agente activador de los grupos carboxílicos en la reacciones de aminación química. La recuperación de los residuos aminoacídicos de tirosina modificados en los procesos de aminación se hace posible mediante el tratamiento con hidroxilamina (Gilles *et al;* 1999; Alcalde, 1999).

Por otra parte, la modificación de los grupos amino de las proteínas con anhídrido succínico o mediante reacciones de *succinilación*, confiere a la superficie de la proteína un nuevo grupo carboxilato, cargado negativamente, modificando de esta manera la carga positiva característica de los grupos amino. El mecanismo de reacción se muestra en la figura 7 (Alcalde, 1999).

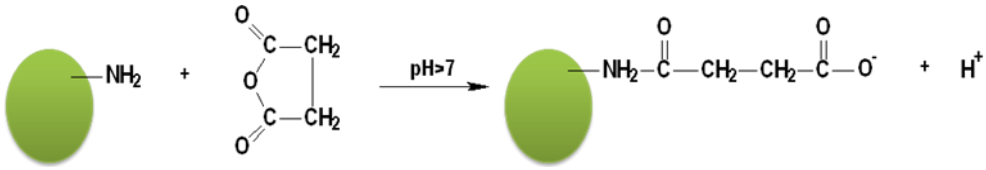


Figura 7. *Reacción de succinilación con anhídrido succínico de los grupos amino de la superficie de la proteína*

Las diferentes estrategias de modificación química, tales como aminación o succinilación, generan un cambio en la carga neta de la proteína. En este sentido, las reacciones de aminación incrementan el número de cargas positivas y por tanto el punto isoeléctrico de la proteína. El efecto contrario, es ejercido por las reacciones de succinilación, que al disminuir la carga positiva, provocan un descenso en el punto isoeléctrico de la proteína. El revestimiento de la superficie de la enzima con cargas positivas o negativas puede fácilmente modificar las interacciones que mantienen la estructura de la lipasa así

como su movilidad, de manera que estos cambios podrían afectar las propiedades biocatalíticas de las lipasas (Cabrera *et al*; 2009).

En este contexto, diferentes autores han dedicado gran parte de sus investigaciones a estudiar el efecto de la modificación química sobre las propiedades de las lipasas. Cabrera y colaboradores en el 2009 utilizaron la Cal-B inmovilizada en resinas poliméricas macroporosas, conocida comercialmente como Novozymes 435, para evaluar el efecto de la modificación química y física en las propiedades catalíticas de la enzima. Novozymes 435 fue completamente modificada por reacciones de succinilación, aminación y recubierta con polímeros como dextrano y polietilenimina. El efecto de los diferentes tipos de modificación fue evaluada en la resolución cinética de tres diferentes sustratos: **(1)** ácido butiril fenil acético, **(2)** metil ester de ácido mandélico y en la hidrólisis del **(3)** diester dimetil fenil glutárico**.**

En la hidrólisis de los sustratos 1 y 2 se observó que la succinilación causó una pérdida de al menos 50 % de la actividad, las demás preparaciones modificadas con polímeros iónicos y por reacciones de aminación presentaron una menor reducción en la actividad. Sin embargo, en la hidrólisis asimétrica del compuesto 3, todos los tipos de modificación química produjeron un incremento en la actividad de la CAL-B inmovilizada, como se registra en la figura 8. Este efecto es atribuido a la alteración del comportamiento de la lipasa por las modificaciones químicas y físicas, encargadas de modular las interacciones que mantienen la estructura de la lipasa, así como del sitio activo, de manera que las propiedades catalíticas se ven afectadas.

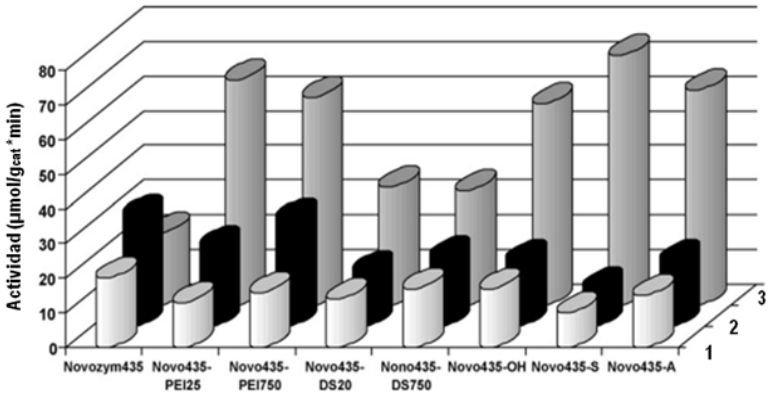


Figura 8*. Actividad hidrolítica de las diferentes preparaciones de Novozymes-435 en la hidrólisis de tres diferentes sustratos. Figura tomada de Cabrera et al; 2009*

Por otra parte, en el 2009 Rodrígues y colaboradores estudiaron el efecto de la modificación química mediante aminación en las propiedades de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus.* Esta enzima cuenta con una baja distribución y contenido de lisinas en la superficie, haciendo que el proceso de inmovilización en soportes de glioxil agarosa sea lento, aproximadamente 15 horas. Sin embargo, la TLL aminada fue inmovilizada en un tiempo muy corto, recuperando alrededor del 65 al 70% de actividad enzimática. Caso contrario ocurre con la TLL soluble o no modificada que es inactivada antes de ser inmovilizada debido a la lenta velocidad de inmovilización (Rodrígues *et al*; 2009)

La aminación química aporta nuevos grupos aminos más reactivos a la superficie de la enzima. Estos nuevos grupos presentan un bajo pK de 9.2 en comparación a los grupos amino de la lisina que presentan un pK de 10.7. De esta manera, la aminación de la enzima permite realizar la inmovilización sobre soportes de glioxil agarosa de una forma más

rápida y a un pH más bajo que las condiciones estándar (pH 10) de inmovilización (Fernández *et al;* 1993)

En el 2004 Lopez-Gallego y colaboradores estudiaron el efecto de la modificación parcial, por reacciones de aminación con etilendiamina de las enzimas Penicilin G acilasa (PGA) y Glutaril acilasa (GA) sobre la facilidad de inmovilización en soportes de glioxil agarosa. PGA posee en su estructura 41 residuos aminoacídicos de lisina a diferencia de GA que sólo presenta 9 residuos lisínicos.

La inmovilización sobre soportes de glioxil agarosa de PGA modificada por aminación de manera parcial presentó una rápida inmovilización, conservando el 100% de su actividad, Sin embargo, GA no modificada presentó una lenta inmovilización sobre los mismos soportes, alcanzando sólo el 50% de la inmovilización después de 4 horas, mientras que GA modificada fue inmovilizada al transcurrir una hora.

De acuerdo con lo anterior, la modificación química por reacciones de aminación incrementa los sitios de unión de la superficie de la lipasa a los soportes de glioxil agarosa cargados negativamente, facilitando de ésta manera la inmovilización de la proteína. El mecanismo hipotético de inmovilización de enzimas sobre soportes de glioxil agarosa se observa en la figura 9.

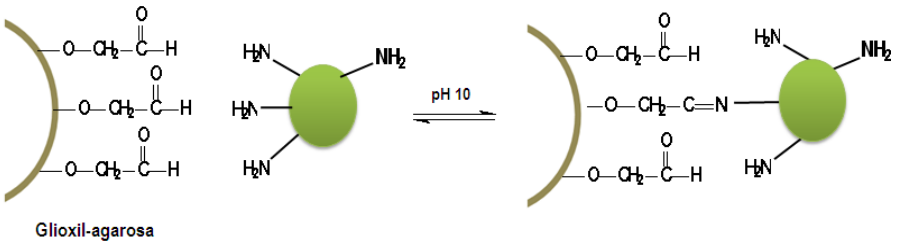


Figura 9. *Mecanismo de inmovilización de enzimas sobre soportes glioxil-agarosa*

1.2.2 Insolubilización de proteínas mediante la síntesis de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs)

Se han empleado diversas técnicas de inmovilización con el objetivo de obtener biocatalizadores estables, catalíticamente activos y de fácil re-uso. En general, las técnicas de inmovilización de proteínas reúnen a todos aquellos métodos que logran el confinamiento o localización de las moléculas de enzima en un espacio definido y limitado, de manera que las nuevas formas insolubles retengan su actividad catalítica y permitan su reutilización (Cao *et al;* 2003; Arroyo, 1998).

Las estrategias de inmovilización pueden organizarse en dos grupos: retención física de las moléculas en un espacio limitado e insolubilización por unión química de las moléculas entre sí o a una estructura sólida. Dentro de este último grupo, las enzimas pueden ser inmovilizadas al enlazarse mediante interacciones hidrofóbicas o electrostáticas con una determinada superficie. Es decir, este tipo de inmovilización requiere de un soporte (masa no catalítica) sobre el cual está ligada la masa funcional de la enzima, de manera que las características físicas y químicas de tal superficie pueden modificar considerablemente las propiedades de la enzima (Cao *et al*; 2003).

En el caso en que la insolubilización ocurre en ausencia de soportes, no se requiere de una masa inactiva o transportadora, de forma tal que la insolubilización puede darse por la formación de enlaces covalentes, en los que participa la enzima y un agente bifuncional que permita el entrecruzamiento intermolecular (Amotz, 1987; Arroyo, M; 1998).

La técnica de entrecruzamiento de proteínas, por reacción del glutaraldehído como agente bifuncional con los residuos amino reactivos en la superficie de la enzima, fue inicialmente desarrollada en los años 1960s. Sin embargo, esta metodología de producción de *enzimas entrecruzadas (CLE)* presentó varios inconvenientes, tales como baja retención de la actividad, baja estabilidad mecánica y grandes dificultades en el manejo de la mezcla gelatinosa (CLEs) (Shoevaart *et al;* 2004; Lopez-Serrano *et al;* 2002).

Para resolver estas dificultades se desarrolló el *entrecruzamiento de enzimas cristalizadas (CLEC),* que constituyó la primera aplicación para estudios por difracción de Rayos X. Posteriormente, se comercializaron las enzimas cristalizadas y entrecruzadas para ser usadas como biocatalizadores industriales. Sin embargo, una desventaja de los CLECs es la necesidad de cristalizar las enzimas, lo que representa un trabajo bastante laborioso y requiere de una alta pureza de la proteína (Cao *et l;* 2001; Shoevaart *et al*; 2004).

No obstante, se han alcanzado resultados comparables a los obtenidos con CLECs por precipitación de la enzima y el posterior entrecruzamiento de los resultantes agregados físicos, tal como se describe en la figura 10. Esto conllevó a una nueva forma de inmovilización de enzimas, denominada e*ntrecruzamiento de enzimas agregadas (CLEA).*

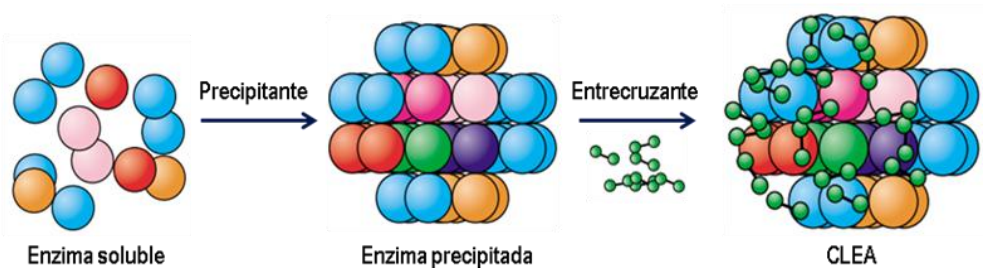


***Figura 10**. Método de entrecruzamiento de agregados enzimáticos*

En los CLEAs, la agregación o precipitación es inducida por adición de sales, solventes orgánicos, polímeros no iónicos o ácidos. Debido a que el agente agregante puede alterar la conformación de la enzima tras la precipitación, las propiedades de la enzima agregada pueden verse muy influenciadas por la naturaleza propia del agente precipitante, cuya adecuada selección permitirá la alta retención de la actividad catalítica. Los agregados físicos, son estructuras supramoleculares unidas por enlaces no covalentes y pueden re-disolverse cuando es eliminada la causa de agregación, por lo que no pueden utilizarse en solución acuosa, de manera que se hace necesario el paso de entrecruzamiento (Sheldon, 2007).

Los agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) son una excelente herramienta en la preparación de nuevos biocatalizadores. Los CLEAs son estables en un amplio rango de temperatura y pH, son tolerantes a las condiciones del medio y fácilmente reutilizables. En este contexto, una amplia gama de investigaciones han estado direccionadas en el mejoramiento de la actividad y estabilidad de los agregados enzimáticos entrecruzados:

En el 2006 Shah y colaboradores usaron albúmina de suero bovino (BSA) como proteína alimentadora, con el objetivo de obtener una alta

actividad cuando la concentración de enzima es muy baja o cuando la actividad enzimática es vulnerable a la concentración del agente entrecruzante.

En el 2002, López Serrano y colaboradores prepararon agregados enzimáticos entrecruzados de diferentes lipasas microbianas disponibles comercialmente en presencia de surfactantes. La activación de las lipasas por la presencia de aditivos como los surfactantes (SDS-Tritón), es generalmente atribuida a la conformación activa que adopta la lipasa bajo estas condiciones. De esta manera, la enzima sería precipitada en su conformación activa y posteriormente entrecruzada. Bajo estas condiciones los autores prepararon CLEAs de las lipasas de *Thermomyces lanuginosus y Rhizomucor miehei* en presencia de SDS, los cuales fueron 2 y 3 veces más activos que sus enzimas nativas, respectivamente.

El mismo efecto fue observado por Pritesh y colaboradores, quienes en el 2009 prepararon agregados enzimáticos entrecruzados de *Thermomyces lanuginosus* en presencia de aditivos como el SDS. Esta preparación de TLL fue utilizada en la hidrólisis del aceite de oliva. El CLEA fue estable por 10 ciclos en la reacción de hidrólisis, reteniendo más del 90% de su actividad.

Por otra parte, se ha desarrollado la combinación de la tecnología de formación de CLEAs con otros métodos de inmovilización: En el 2010, Wang y colaboradores prepararon agregados enzimáticos entrecruzados de papaína sobre los poros de sílica gel disponible comercialmente (GMS) y previamente modificada con grupos amino como se muestra en la figura 11. En este caso se observó que los CLEAs de papaína alojados sobre los poros de la sílica gel fueron más

estables térmicamente que los agregados enzimáticos entrecruzados preparados de manera convencional.

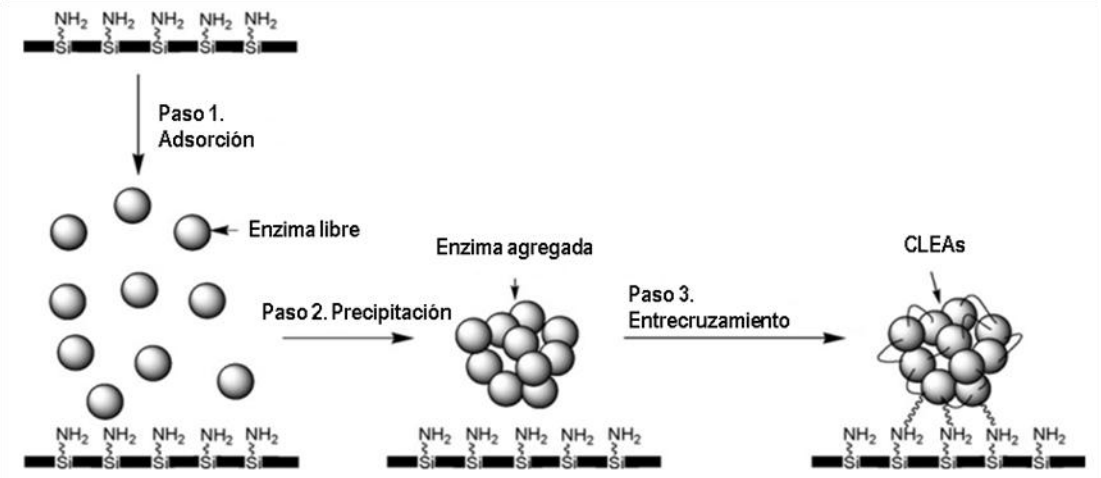


Figura 11. *Síntesis de agregados enzimáticos entrecruzados sobre los poros de sílica gel modificada. Figura tomada de Wang et al; 2010.*

Se han empleado otras herramientas en la síntesis de agregados enzimáticos entrecruzados con propiedades mejoradas: en el 2011, Wang y colaboradores utilizaron la estrategia de precipitación asistida con azúcares con el fin de reducir las pérdidas de actividad causadas durante la precipitación de las enzimas. El agente precipitante usualmente induce la desnaturalización de la enzima al causar rupturas en su estructura o la adopción de otras conformaciones, lo que conlleva a la pérdida de actividad de la enzima y la consecuente baja actividad del CLEA resultante.

La adición de azúcares permite conservar la capa acuosa de la superficie de la proteína, protegiendo la estructura terciaria de la misma. En este estudio se observó que al preparar CLEAs de Penicilina G

acilasa (PGA) por precipitación asistida con 20% de azúcar (glucosa, sucrosa y trehalosa), la actividad de la enzima agregada era incrementada entre el 10% y 40% en comparación a la formación de CLEAs de manera convencional, es decir, libre de azúcares.

En este sentido, las propiedades finales del los agregados enzimáticos entrecruzados están directamente relacionadas con las condiciones de precipitación y entrecruzamiento, junto con la consecuente conformación que la enzima adopta durante el proceso.

Por otra parte, la formación de los CLEAs, y en particular, el paso de entrecruzamiento con un agente bifuncional como el glutaraldehído, puede verse limitado o favorecido por el número de residuos lisínicos presentes en la superficie de la proteína.

En el 2006, Wilson y colaboradores, al preparar CLEAs de *Alcaligenes sp (QL) y Candida antarctica B (CAL-B)*, observaron que al ser incubados en solución buffer los CLEAs liberaban enzima al sobrenadante, lo cual indicaba un entrecruzamiento poco efectivo. Para resolver este problema, los autores utilizaron agentes co-precipitantes (polietilenimina) con gran contenido de grupos amino que facilitarían finalmente el proceso de entrecruzamiento. En este último caso, se observó que al incubar los nuevos CLEAs en buffer y aun en condiciones drásticas, en presencia de SDS, no hubo liberación de enzima al sobrenadante, indicando un adecuado alcance en el proceso de entrecruzamiento.

De acuerdo con lo anterior, la modificación química por reacciones de aminación, la cual provee a la enzima de nuevos grupos amino, permitirá un entrecruzamiento efectivo entre la proteína modificada y el

agente entrecruzante, dando lugar a la formación de nuevos biocatalizadores o CLEAs.

En este sentido, el uso de las diferentes estrategias de insolubilización y modificación química, lo que busca es mejorar las propiedades de las lipasas que serán finalmente utilizadas a nivel industrial (Cao *et al,* 2003; Kim *et al;* 2006).

1.3 USO DE LAS LIPASAS MICROBIANAS COMO BIOCATALIZADORES

La diversidad natural que presentan las enzimas y las múltiples estrategias empleadas para la mejora de sus propiedades, han permitido el acceso a una amplia gama de biocatalizadores con propiedades de amplio uso a nivel industrial (Rozell, 1999).

En el 2007 Cabrera y colaboradores hicieron uso de las propiedades de selectividad de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus,* con el fin de hidrolizar de manera selectiva el dietilfenil malonato. La hidrólisis completa de éste sustrato da lugar a un producto no quiral, mientras que el intermediario de ésta reacción es un compuesto quiral, según se muestra en la figura 12.

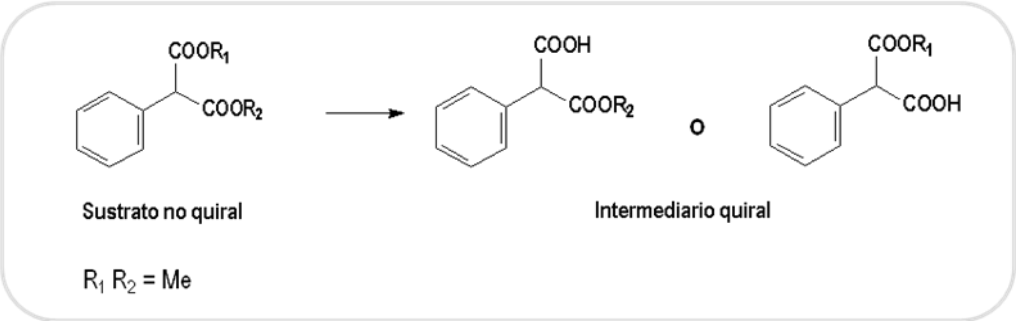


Figura 12. *Hidrólisis enzimática selectiva de diésteres dicarboxílicos fenilmalónico*

Para esta reacción, TLL inmovilizada en soportes de octil agarosa e inmovilizada en soportes activados con Bromo cianógeno (BrCN) resultó ser *altamente selectiva* en la hidrólisis de un solo grupo del sustrato diéster, en preferencia al monoéster, dando lugar a la formación del compuesto quiral. De esta manera, las diferentes preparaciones de TLL en octil agarosa y en soportes activados con bromocianógeno demostraron ser selectivas a la hora de hidrolizar el diéster con la consecuente generación de un producto quiral.

Gracias a sus propiedades de actividad, selectividad y enantioselectividad, las lipasas encuentran prometedoras aplicaciones en muchos campos: formulaciones de detergentes, síntesis de biosurfactantes, en la industria oleoquímica, láctea y agroquímica, en la fabricación de papel y en la transformación de fármacos (Sharma *et al*; 2001)

1.3.1 Resolución cinética catalizada por lipasas

La resolución cinética de compuestos racémicos es probablemente la biotransformación por excelencia de las lipasas en procesos de síntesis orgánica de compuestos con especial interés en la industria farmacéutica. Los compuestos enantioméricamente puros se han convertido en uno de los focos principales de atención en síntesis orgánica. Esto puede ser atribuido al incremento en la demanda de compuestos con éstas características en química fina (Pámies y Backall, 2004).

La resolución cinética se basa en la diferente velocidad de reacción de cada uno de los enantiómeros de una mezcla racémica con un agente quiral (biocatalizador). En el caso ideal, la diferencia de velocidad de reacción es tan elevada que uno de los enantiómeros reacciona muy

rápidamente para dar el producto correspondiente, mientras que el otro enantiómero no reacciona y puede ser recuperado al final de la reacción. El rendimiento máximo que se puede obtener en una resolución cinética es del 50 % (Matute; 2006).

La reacción de resolución cinética catalizada por lipasas para un sistema reversible se puede representar como se muestra en la figura 13. En el estado inicial de la reacción la enzima reacciona preferiblemente sobre el enantiómero A (reactante más rápido) y lo transforma en su respectivo producto P, mientras la concentración del enantiómero B (reactante lento) se mantiene mayoritariamente intacta. Cuando se establece el equilibrio entre el enantiómero A y el producto P, la concentración del enantiómero B comienza a cambiar, disminuyendo la pureza óptica del enantiómero A remanente y del producto P. Por esta razón, el tiempo óptimo para terminar la resolución es cuando se haya alcanzado el equilibrio del reactante rápido (Chen *et al*; 1987).

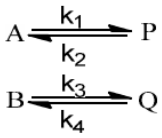


Figura 13. *Resolución cinética catalizada por lipasas para un sistema reversible. La resolución ocurre cuando k_1 es diferente de k_3, tal que entre mayor sea la diferencia una, mayor resolución es obtenida.*

La resolución de racematos a través de la resolución cinética catalizada por lipasas es uno de los métodos más usados para el acceso a los compuestos enantioméricamente puros. De todos los métodos utilizados en la resolución cinética, la esterificación catalizada por lipasas en solvente orgánico es uno de los más empleados. Así, en

presencia de un donador acilo adecuado, un disolvente apropiado, con la actividad acuosa adecuada y en la temperatura óptima, un enantiómero de la mezcla racémica se transforma totalmente de manera selectiva al correspondiente éster dejando el segundo enantiómero sin reaccionar y también en su forma pura (Ghanem *et al*; 2004).

A la hora de utilizar las lipasas en medios orgánicos como biocatalizadores en reacciones de esterificación o transestericación, es posible que surjan algunos inconvenientes, tales como la disminución de la actividad enzimática generada por el microambiente que rodea la enzima y las dificultades asociadas con la reversibilidad en las reacciones de esterificación y transesterificación (Reetz; 2002).

En este sentido, el contenido de agua en el medio de reacción puede alterar la actividad y estabilidad de la enzima en el medio y el equilibrio de la reacción (Wehtje *et al;* 1997). De la misma manera, la utilización de un adecuado acil-donor es crucial en las reacciones de esterificación o transesterificación catalizadas por lipasas. El agente acilante más apropiado para cada proceso depende del sustrato a esterificar. Por ejemplo, para la resolución de alcoholes, los agentes acilantes más utilizados son ésteres metílicos, anhídridos y especialmente ésteres vinílicos (Gotor-fernández *et al*; 2006). Sin embargo, el acetato de vinilo es el agente acilante mas adecuado para esterificaciones y transesterificaciones de alcoholes secundarios por favorecer la irreversibilidad de las reacciones (Reetz, 2002).

1.3.2 Enantioselectividad de las lipasas

Puesto que las lipasas poseen la propiedad de discriminar entre dos enantiómeros de una mezcla racémica, la efectividad de los

biocatalizadores lipásicos en la resolución enantioselectiva de compuestos quirales es medida a través de dos parámetros: 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:

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

Ecuación (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%). La enantioselectividad es generalmente medida o expresada a través de la relación o razón enantiomérica (*E)*. Este parámetro cinético depende del catalizador, además de ser sensible a cambios en el medio (pH, temperatura, etc.). La razón enatiomérica (*E)* se puede definir como la relación entre las constantes específicas de velocidad para los dos enantiómeros:

$$E = \frac{k_1}{k_3} = \frac{\left(k_{cat}/K_M\right)_R}{\left(k_{cat}/K_M\right)_S} \quad ;$$

Ecuación (2)

Donde R es el enantiómero reactante más rápido, k_{cat} es la constante de velocidad de la reacción y K_M es la constante de Michaelis-Menten. Sih y col, (1987) desarrollaron esta ecuación en términos de 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:

$$E = \frac{Ln\left[1-(1+K)c(1+ee_p)\right]}{Ln\left[1-(1+K)c(1-ee_p)\right]} = \frac{Ln\left[1-(1+K)(c+ee_s\{1-c\})\right]}{Ln\left[1-(1+K)(c-ee_s\{1-c\})\right]}$$ **Ecuación (3)**

Donde *K* es la constante de equilibrio. *K* es una función termodinámica que es independiente de las propiedades de la enzima. Como función de estado, *K* sólo depende del estado inicial y final más no de la trayectoria de reacción. Sih y col (1987), determinaron que la pureza óptica de los compuestos (producto y sustrato remanente) varía de manera inversa con la constante de equilibrio aún para sistemas con alta enantioselectividad (*E* > 1000). Cuando la reacción es irreversible o la reacción reversa es insignificante (*K* = 0), la ecuación 3 puede ser reducida a:

$$E = \frac{Ln\left[1-c(1+ee_p)\right]}{Ln\left[1-c(1-ee_p)\right]} = \frac{Ln\left[(1-c)(1-ee_s)\right]}{Ln\left[(1-c)(1+ee_s)\right]}$$ **Ecuación (4)**

Donde c está expresada por la siguiente ecuación:

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p}$$ **Ecuación (5)**

Para calcular el valor de E, es posible 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.

1.3.3 Resolución cinética de R/S- Propanolol, catalizada por lipasas

En la industria farmacéutica la resolución cinética es de especial interés debido a que muchos de los productos farmacéuticos se comercializan en mezclas racémicas y pueden causar efectos secundarios o tóxicos, ya que pueden inhibir la acción biológica del enantiómero adecuado (Barbosa *et al*; 2010).

Un importante grupo de fármacos quirales son los aminoalcoholes. Este conjunto de compuestos orgánicos han sido usados como agentes bloqueadores beta-adrenérgicos, los cuales juegan un papel importante en el tratamiento de diversas enfermedades. Por ejemplo, el propanolol (1-isopropilamino-3-(1-naftoxi)-2-propanol), que se muestra en la figura 14, es un conocido amino-alcohol usado para el tratamiento de desórdenes hipertensivos y cardiovasculares, encontrándose comercialmente disponible como una mezcla racémica (Barbosa *et al*; 2010).

No obstante, la administración en su forma racémica ha causado efectos secundarios tales como broncoconstricción en pacientes asmáticos y diabetes en pacientes hipertensos (Goodman y Gillman, 1985; Avila *et al*; 2005). Estos efectos se atribuyen al enantiómero R del propanolol (Eber *et al*; 1990). En la mezcla racémica R/S- propanolol, cada isómero presenta un efecto farmacológico distinto; por ejemplo, el isómero (S)-propranolol es 98 veces más potente como antiarrítmico y antihipertensivo que el (R)-propranolol. Por esta razón, es que la resolución cinética de compuestos empleados como fármacos es una de las áreas científicas con mayor desarrollo actualmente.

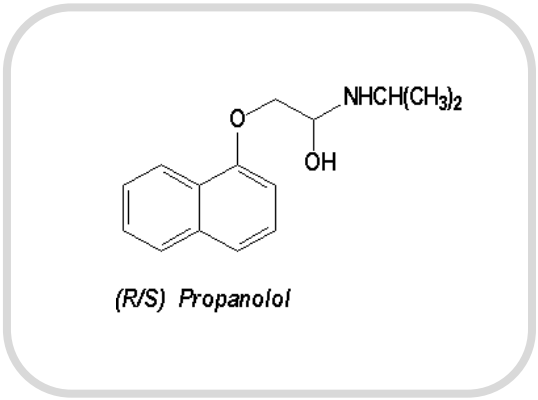


Figura 14. *Estructura del R/S-propanolol, molécula antagonista de los receptores β-adrenérgicos*

1.5 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE DISTINTAS LIPASAS

En esta investigación se emplearon dos diferentes lipasas obtenidas de diferentes fuentes microbianas (hongos y levaduras), las cuales se encuentran disponibles comercialmente y algunas con características conocidas a nivel bioquímico-estructural.

Lipasa de *Candida antarctica B (Cal-B)*

La lipasa de *Candida antarctica B* es una de las isoenzimas expresadas por la levadura de *Candida antarctica.* Cal-B tiene un peso molecular en torno a 32 KDa y un punto isoeléctrico (pI) de 6. Es una proteína altamente robusta que se desactiva entre 50 y 60ºC. Cal-B presenta especificidad en las posiciones 1 y 3 respecto a los triglicéridos y es muy activa sobre un rango muy amplio de ésteres no naturales.

Cal-B es considerada una especie intermedia de esterasa y lipasa típica, ya que no muestra un efecto pronunciado de activación interfacial. Por lo anterior, es posible que Cal-B no posea región de tapadera que regule el acceso al centro activo, sino que su estructura es como si estuviese siempre en conformación abierta, con una entrada

bastante restringida al centro activo constituido por los residuos aminoacídicos de Ser 105, Asp 187, His 224 (Pérez y Moreno, 2006).

Lipasa de *Thermomyces lanuginosus (TLL)*

TLL es secretada por el hongo filamentoso y termofílico de *Thermomyces lanuginosus.* TLL es un polipéptido de una sola cadena con un peso molecular de 30 KDa, es estable en un rango de pH de 4 a 11, y muestra su actividad máxima a 60ºC. Sin embargo, es inactivada tras ser calentada 80ºC por 20 minutos (Pérez y Moreno, 2006).

El centro activo de TLL comprende el residuo de Ser 146, His 258 y Asp 201 de la cadena aminoacídica. Éste se encuentra enterrado bajo un tramo corto de hélice que actúa como tapadera. Se ha resuelto tanto su forma cerrada como abierta, mostrando claramente el movimiento de la tapadera para exponer el centro activo a potenciales sustratos.

Respecto a la hidrólisis de triglicéridos la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* no presenta especificidad de posición. La principal aplicación de TLL es como aditivo en detergentes con el fin de facilitar la disolución de las grasas. Su uso en síntesis orgánica se ha ido ampliando cada vez más entre los diferentes biocatalizadores disponibles (Pérez y Moreno, 2006).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

Las lipasas de *Candida antarctica B (Cal-B) y Thermomyces lanuginosus (TLL)* fueron obtenidas de Novozymes. (R/S)-Propanolol-HCl y cada uno de los isómeros fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Todos los reactivos para las modificaciones químicas (Etilendiamina (EDA), Carbodiimida (DEC), Anhídrido succínico), soportes de Octil-Agarosa y solventes fueron de grado analítico y suministrados por las casas científicas de Sigma-Aldrich y Merck.

2.2 MÉTODOS EXPERIMENTALES

2.2.1 Purificación del extracto crudo de las lipasas de *Candida Antarctica B (Cal-B) y Thermomyces Lanuginosus (TLL)*

Las lipasas de *Candida antarctica B (Cal-B) y Thermomyces lanuginosus (TLL)* fueron purificadas por cromatografía de adsorción interfacial de acuerdo con la metodología propuesta por Sabuquillo y colaboradores (Sabuquillo *et al*; 1998), utilizando soportes hidrofóbicos de octil agarosa.

Adsorción interfacial de las enzimas (Cal-B y TLL) en soportes de octil agarosa

La purificación de Cal-B y TLL se realizó a baja fuerza iónica mediante el uso de buffer fosfato 5mM a pH 7. La inmovilización en soportes hidrofóbicos de octilagarosa se realizó manteniendo una relación 1:10 (v/v) de soporte y solución enzimática, respectivamente. Periódicamente, se obtuvieron muestras del sobrenadante y suspensión para ser analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), de acuerdo con Laemmli (1970) y para determinar su

actividad tal como se describe en la sección 2.3.1 Al finalizar el proceso de inmovilización, la suspensión fue filtrada para recuperar la enzima que se encontraba en fase sólida es decir, adsorbida sobre el soporte de octil agarosa. El biocatalizador obtenido fue lavado con abundante agua destilada.

Desorción de las enzimas (Cal-B y TLL) del soporte octil agarosa

La Cal-B adsorbida sobre el soporte de octil-agarosa fue incubada en una solución buffer fosfato a pH 7 que contenía el surfactante no iónico tritón X-100 al 1% (v/v). La TLL adsorbida en octil agarosa fue incubada en una solución de buffer fosfato pH 7, que contenía el detergente catiónico CTAB al 0.6% (v/v). La desorción de las enzimas se realizó manteniendo una relación 1/10 (v/v) de derivado enzimático y detergente, respectivamente. Periódicamente, se obtuvieron muestras del sobrenadante y suspensión determinando la actividad como se describe en la sección 2.3.1.

2.2.2 Estudio del efecto de la modificación química sobre las propiedades de las lipasas de *Candida Antarctica B (Cal-B) y Thermomyces lanuginosus (TLL)* inmovilizadas en soportes de octil agarosa

Una vez en fase sólida, es decir adsorbidas en soportes de octil agarosa, las lipasas de Cal-B y TLL fueron modificadas mediante reacciones de *Aminación y Succinilación química.* La modificación química por reacciones de aminación de la lipasa de *Cándida antarctica B* fue realizada en conjunto con la profesional en Química Mónica Irene Ruiz.

Aminación de lipasas inmovilizadas en soportes de octil agarosa

Un gramo de la lipasa inmovilizada en soportes de octil agarosa fue incubado en una solución de Etilendiamina (EDA) 1M a pH 4.75 bajo agitación suave. A ésta suspensión, se adicionó carbodiimida (DEC) sólida hasta una concentración final de 0.2mM, 1mM y 10mM, con el fin de alcanzar diferentes grados de modificación. Tras 90 minutos de reacción, la suspensión fue filtrada y lavada con abundante agua y buffer fosfato 25mM. Las preparaciones aminadas de Cal-B y TLL (CalB-A-10%, CalB-A-50%, CalB-A-100%, TLL-A-10%, TLL-A-50%, TLL-A-100%) fueron conservadas a 4ºC.

- ***Recuperación de los residuos de tirosina***

La enzima modificada por aminación fue incubada en una solución de hidroxilamina 1M pH 8, para la recuperación de los residuos de tirosina. Después de 60 min de reacción, la suspensión que contenía el derivado enzimático fue filtrada y lavada con agua y solución buffer fosfato 25mM. Las preparaciones aminadas de Cal-B y TLL cuyos residuos de tirosina habían sido recuperados (CalB-H-10%, CalB-H-50%, CalB-H-100%, TLL-H-10%, TLL-H-50%, TLL-H-100%) fueron conservadas a 4ºC.

Succinilación de lipasas inmovilizadas en soportes de octil agarosa

Un gramo de lipasa inmovilizada en soportes de octil agarosa fue incubado en buffer fosfato 50mM, pH 8 en una relación 1:10. Bajo agitación rápida, se adicionó a la suspensión pequeñas porciones de anhídrido succínico hasta una concentración final de 0,1mM, 20mM y 100mM, el pH de la suspensión se mantuvo en 8 mediante la adición de NaOH 0,1M. Una vez completada la adición del anhídrido succínico la

mezcla se dejó reaccionar por 2 horas. Finalmente, la suspensión fue filtrada y lavada con abundante agua. Los derivados succinilados de Cal-B y TLL (CalB-S-10%, CalB-S-50%, CalB-S-100%, TLL-S-10%, TLL-S-50%, TLL-S-100%) fueron conservados a 4ºC.

2.2.2.1 Evaluación de la estabilidad de las lipasas inmovilizadas en octil agarosa sin modificar y modificadas por aminación y succinilación química

Evaluación de la estabilidad térmica

Los diferentes derivados de Cal-B y TLL modificados y sin modificar por reacciones de aminación y succinilación química, fueron incubados en buffer fosfato 25mM, pH 7 a 70ºC. Periódicamente, se obtuvieron muestras de la suspensión y se determinó su actividad como se describe en la sección 2.3.1.

Evaluación de la estabilidad frente a solventes orgánicos

Las diferentes derivados de Cal-B y TLL modificados y sin modificar por reacciones de aminación y succinilación química, fueron incubados a temperatura ambiente (25ºC) en una mezcla de solvente orgánico Tetrahidrofurano (THF)/buffer Tris-HCl 50mM pH 7, en una relación 1/1 (v/v). Periódicamente se obtuvieron muestras de la suspensión y se determinó su actividad como se describe en la sección 2.3.1.

2.2.3 Síntesis de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) de Cal-B y TLL

La preparación de los agregados enzimáticos entrecruzados de Cal-B y TLL se realizó siguiendo el procedimiento relacionado a continuación en la figura 15:

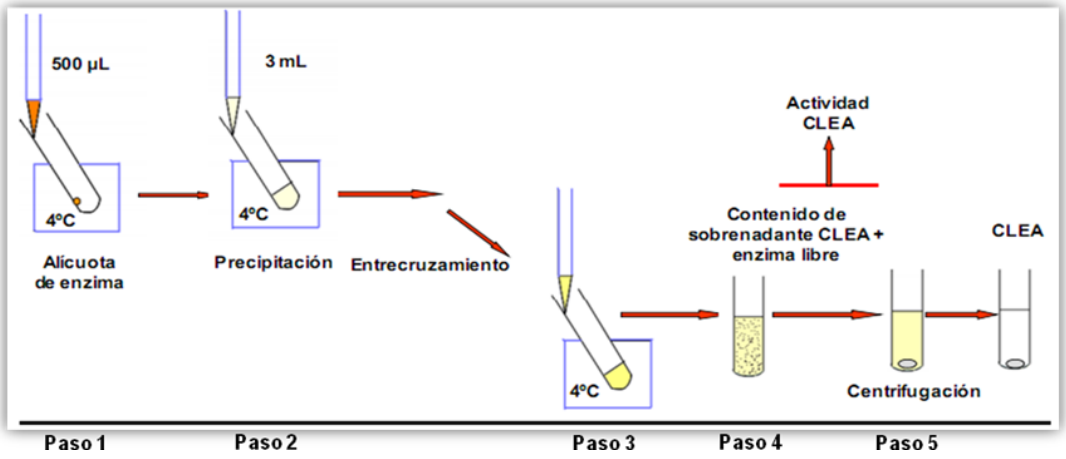


Figura 15. *Procedimiento para la síntesis de agregados enzimáticos entrecruzados CLEAs*

A un volumen de 0.5 ml de la enzima se adicionó 3.0 ml del agente precipitante, el cual se dejó reaccionar por 1 hora a 4ºC. Posteriormente, se adicionó glutaraldehído al agregado precipitado de la lipasa inmediatamente formado. De la suspensión que contenía agregados entrecruzados de la lipasa y enzima libre que no reaccionó con el glutaraldehído, se extrajo una alícuota determinando su actividad catalítica tal como se describe en la sección 2.3.1.

La suspensión que contenía los agregados entrecruzados insolubles y la enzima libre fue centrifugada a 7000 rpm por 10 min. Del sobrenadante se extrajo una alícuota y se determinó la actividad catalítica como se describe en la sección 2.3.1. Finalmente, la actividad catalítica de los agregados enzimáticos entrecruzados de Cal-B y TLL se determinó como la diferencia entre la actividad catalítica de la suspensión (Paso 4) y la actividad del sobrenadante (paso 5) en U/g-CLEA.

Selección de las mejores condiciones de precipitación

Con el propósito de hallar el mejor agente precipitante en la preparación de CLEAs, se seleccionaron como posibles agentes precipitantes para la lipasa de *Candida antarctica B (*Cal-B), el alcohol *terc*-butílico, sulfato de amonio y 1-Propanol; y etanol, sulfato de amonio y, 2-propanol para la lipasa de *Thermomyces lanuginosus (TLL)*

Para la selección del mejor agente precipitante, se utilizó un extracto soluble de proteína de igual concentración en cada uno de los ensayos (1mg/ml). La reacción se mantuvo a pH 7 y 4ºC. El tiempo de precipitación fue de 1 hora. Por cada agente precipitante se realizaron tres ejecuciones, en las que se varió la concentración del agente precipitante 50%, 70% y 90% (v/v), según se describe en la tabla 1 y 2.

Tabla 1. *Selección del mejor agente precipitante para la lipasa de Candida antarctica B (Cal-B)*

CONDICIONES DE PRECIPITACIÓN PARA LA CAL-B			
Agente Precipitante [A.P]	*t*-Butanol	$(NH_4)_2SO_4$	1-Propanol
Concentración A.P [%v/v]	90	70	50

Tabla 2. *Selección del mejor agente precipitante para la lipasa de Thermomyces lanuginosus (TLL)*

CONDICIONES DE PRECIPITACION PARA LA TLL			
Agente Precipitante [A.P]	$(NH_4)_2SO_4$	2-Propanol	Etanol
Concentración A.P [%v/v]	90	70	50

Síntesis de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) a partir de lipasas modificadas mediante reacciones de aminación

Bajo las mejores condiciones encontradas para la precipitación de Cal-B y TLL, se prepararon CLEAs a partir de lipasas previamente modificadas al 100% por reacciones de aminación química (Cal-B-A-100%, TLL-A-100%), usando una concentración de glutaraldehído al 1%(v/v). El tiempo de precipitación y entrecruzamiento fue de 1 hora en ambos casos, y la reacción se mantuvo a pH 7 y 4ºC. Los nuevos derivados enzimáticos CLEA-CalB y CLEA-TLL fueron conservadas a 4ºC.

Evaluación de la estabilidad térmica de los CLEAs de Cal-B y TLL

Los agregados enzimáticos entrecruzados de Cal-B y TLL (CLEA-CalB, CLEA-TLL), fueron incubados en buffer fosfato 25mM, pH 7 a 70ºC. Periódicamente se obtuvieron muestras de la suspensión y se determinó su actividad como se describe en la sección 2.3.1.

2.2.5 Evaluación de la enantioselectividad de los agregados enzimáticos entrecruzados de CAL-B y TLL en la resolución cinética del R/S-Propanolol

Una vez obtenidos los agregados enzimáticos entrecruzados de CAL-B y TLL, se evaluó la enantioselectividad expresada por estos biocatalizadores en la resolución cinética del sustrato quiral, (R/S)-propanolol, el cual es un sustrato de interés farmacéutico como agente beta-bloqueador del sistema nervioso central.

La resolución cinética se llevó a cabo mediante una reacción de transesterificación de la mezcla racémica del sustrato de interés (R/S)-propanolol, utilizando acetato de vinilo como donor acilo y tolueno como solvente orgánico. Como biocatalizador fueron utilizados los

agregados enzimáticos entrecruzados de Cal-B y TLL, preparados mediante el uso de enzimas previamente modificadas por reacciones de aminación: CLEA-CalB, CLEA-TLL.

La reacción de transesterificación se realizó bajo condiciones previamente estandarizadas. El propanolol (0.1mmol) y el acetato de vinilo (0.3 mmol) fueron disueltos en 4 ml de tolueno. La reacción descrita en la figura 16, fue iniciada con 5 mg del biocatalizador CLEA-CalB y 10 mg CLEA-TLL, en cada caso. La mezcla de reacción fue a agitada a 200rpm y 25ºC por 5 horas. Periódicamente, el progreso de la reacción fue monitoreado extrayendo a diferentes tiempos alícuotas del medio de reacción y analizando los productos formados y el sustrato consumido a través de HPLC.

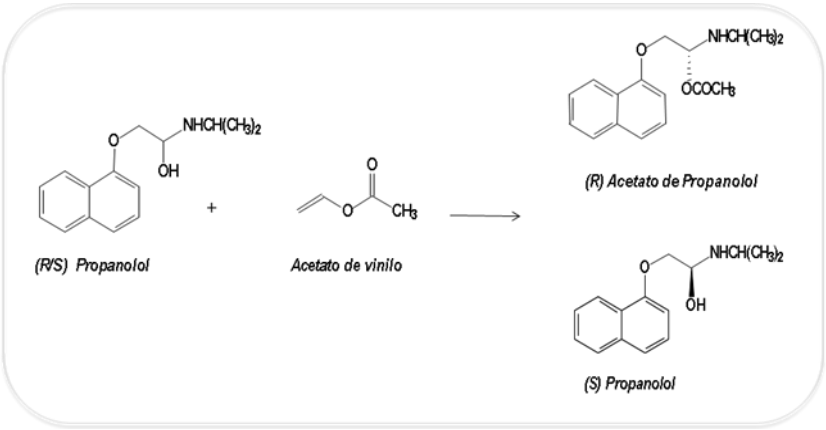


Figura 16. *Resolución cinética del R/S-propanolol catalizada por agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) de Cal-B y TLL*

2.3 METODOS ANALÍTICOS

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

La actividad catalítica de las lipasas se cuantificó mediante el ensayo colorimétrico a partir de la hidrólisis del p-NPB como se muestra en la figura 17. El ensayo se llevó a cabo midiendo el aumento en el valor de absorbancia a 348 nm, producido por la formación del producto, p-nitrofenol (coeficiente de extinción molar= 3100 cm^{-1} M^{-1} a pH 7) generado por la hidrólisis de p-NPB 0.4 mM, disuelto en buffer fosfato sódico 25 mM, pH 7 y a 25 ºC. Para iniciar la reacción, 20 µL de solución lipásica o suspensión se añadieron a 2,5 mL del sustrato. Una unidad internacional de actividad de p-NPB se definió como la cantidad de lipasa que es necesaria para hidrolizar 1µmol de p-NPB por minuto (**U**) bajo las condiciones descritas anteriormente.

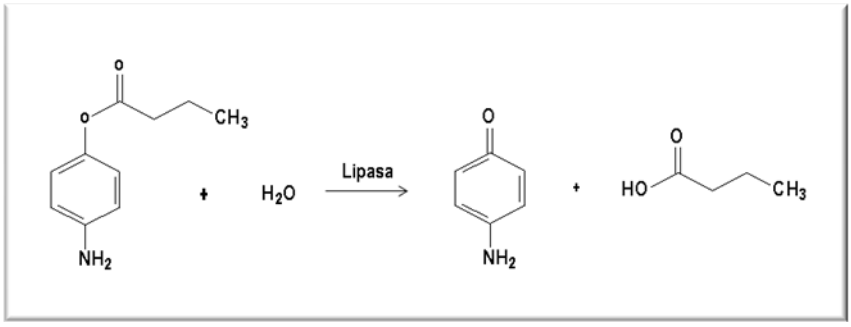


Figura 17. *Reacción de hidrólisis del p-nitrofenilbutirato (p-NPB) catalizada por lipasas microbianas*

2.3.2 Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford

La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford, con base en una curva patrón

utilizando seroalbúmina bovina que relaciona la concentración de proteína con la absorbancia medida a 595 nm. La concentración de proteínas se expresó en mg de proteína por ml de solución (mg/ml) (Bradford, 1976). La curva de calibración se muestra en el anexo 1.

2.3.3 Determinación de los grupos amino primarios libres en la lipasa

La cantidad de residuos amino primarios presentes en la lipasa sin modificar y modificada por reacciones de aminación o succinilación, fue determinada usando el ácido 2,4,6–Trinitrobencensulfónico (TNBS), el cual reacciona con los grupos amino primarios presentes en la superficie de la enzima, bajo condiciones ligeramente alcalinas. 350 mg de la enzima adsorbida en octil agarosa fueron adicionados a 3ml de TNBS 0,1% (v/v), pH 8, la suspensión fue incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez cumplido el tiempo de reacción, la enzima inmovilizada fue lavada con abundante agua destilada. 200 mg del derivado fueron resuspendidos en 2.2 ml de borato de sodio 100mM pH 9, y se determinó la absorbancia a 430 mm (Snyder y Sobocinsky, 1975).

2.3.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las enzimas adsorbidas en el soporte de octil agarosa modificadas y sin modificar por reacciones de aminación y succinilación, así como los agregados enzimáticos entrecruzados de Cal-B y TLL fueron confirmados por electroforesis en condiciones desnaturalizantes y en condiciones nativas.

Electroforesis SDS-PAGE (en condiciones desnaturalizantes)

Las electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE se realizaron según la metodología propuesta por Laemmli (1970), usando geles de

corrido al 12% en una zona de separación de 9 cm x 6 cm. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente 25ºC y 150 mV de voltaje constante utilizando como electrolito Tris-HCl 25 mM-glicina 192 mM y SDS 1%(v/v), por 90 minutos. La enzima inmovilizada fue resuspendida en buffer de ruptura (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 – SDS 2%(v/v) -β-mercaptoetanol 5%(v/v) - glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol al 0,005%(p/v)) y sometida a 100ºC durante 5 minutos. Una alícuota de 20 µL del sobrenadante fue utilizada para los experimentos. El revelado de las proteínas se realizó mediante tinción con azul brillante de Coomassie R-250 y fue usado un marcador de peso molecular de fermentas (10-200 KDa). Los geles obtenidos fueron posteriormente escaneados con un densitómetro UMAX PowerLook 2100XL y visualizados a través del software PDQuest (Biorad).

Electroforesis PAGE-Nativa

100 mg de la lipasa inmovilizada fue resuspendida en 1 ml de solución de Tritón X-100 1%(v/v) en buffer fosfato 25mM pH 7 por 24 horas a 4ºC. Una alícuota de 20 µL del sobrenadante fue mezclada en una relación 1/1 (v/v) con buffer de ruptura, siendo posteriormente analizada en geles de poliacrilamida de acuerdo con la metodología propuesta por Laemmli (1970), usando geles de corrido al 12%, en una zona de separación de 9 cm x 6 cm. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente y 150 mV de voltaje constante por 90 min. El revelado de las proteínas se realizó mediante tinción con azul brillante de Coomassie R-250. Los geles obtenidos fueron posteriormente escaneados con un densitómetro UMAX PowerLook 2100XL y visualizados a través del software PDQuest (Biorad).

2.3.5 Análisis por HPLC

El curso de la reacción de transesterificación del (R/S)-propanolol, fue monitoreado por HPLC (Agilent 1100) usando una columna C-18 en fase reversa (Zorbax C-18, Agilent technologies). La fase móvil consistió de acetonitrilo-buffer fosfato pH 6 (70:30 v/v) y las muestras fueron eluidas a un flujo de 1 ml/min. La identificación se realizó utilizando un detector UV a 289 nm.

Determinación del exceso enantiomérico (ee_s y ee_p) y la enantioselectividad (E)

Se analizó el exceso enantiomérico (ee_s) del S-Propanolol y del éster formado (ee_p) a través de HPLC quiral, para un grado de conversión entre el 15-30% durante la reacción enzimática. Los valores de ee_s y ee_p fueron determinados usando una columna quiral (ES-OVM, Agilent technologies, USA). Como fase móvil se usó una mezcla isocrática de metanol/buffer fosfato pH 6 (30:70 v/v) a un flujo de 1 ml/min. La relación enantiomérica fue calculada usando la ecuación reportada por Chen *et al*; 1982.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Purificación de lipasas microbianas de *Candida antarctica B (Cal-B) y Thermomyces lanuginosus (TLL)* por cromatografía de adsorción interfacial

Cal-B y TLL fueron purificadas a partir de extractos crudos disponibles en forma comercial. La gran afinidad que presentan las lipasas por las interfases hidrofóbicas, fue utilizada para la purificación de la Cal-B y la TLL mediante su adsorción en soportes de octil agarosa a baja fuerza iónica, obteniéndose una inmovilización rápida como se ha descrito en la literatura (Brady *et al;* 1988; Fernandez *et al;* 1998).

En la figura 18 se observa el perfil electroforético en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) del extracto crudo y de la Cal-B purificada por cromatografía de adsorción interfacial. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, en el carril 2 el extracto crudo de la Cal-B presentando una banda a 32 KDa que corresponde al peso de la lipasa de interés. Además, en el carril 2 es evidente la presencia de agregados bimoleculares de la lipasa, con un peso molecular de aproximadamente el doble de su valor y la presencia de impurezas o de lipasa hidrolizada. A su vez se muestra el sobrenadante del proceso de inmovilización, que indica que la mayoría de la lipasa ha sido adsorbida al soporte de octil agarosa (ver Carril 3). Finalmente, en el carril 4 la enzima inmovilizada en el soporte de octil agarosa, indicando que la Cal-B es adsorbida de forma específica sobre el soporte hidrofóbico utilizado.

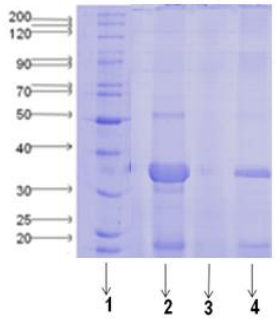


***Figura 18**. Electroforesis SDS-PAGE del extracto crudo y purificado de la Cal-B. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Extracto crudo de Cal-B. Carril 3: Sobrenadante del curso de inmovilización. Carril 4: Cal-B adsorbida en octil agarosa*

En la figura 19 se observa el perfil electroforético en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) del extracto crudo y de la TLL purificada por cromatografía de adsorción interfacial. En ella se observa el extracto crudo de la TLL con una banda característica a 30 KDa, que corresponde al peso de la TLL, además de una banda cerca de los 55 KDa, producto de una enzima contaminante presente en el extracto enzimático (ver Carril 2). En el carril 3, que corresponde al sobrenadante del proceso de inmovilización, se observa nuevamente la banda de 55 KDa, lo que indica que ésta proteína no se adsorbe al soporte de octil agarosa. Finalmente, en el carril 4 la enzima adsorbida en el soporte de octil agarosa.

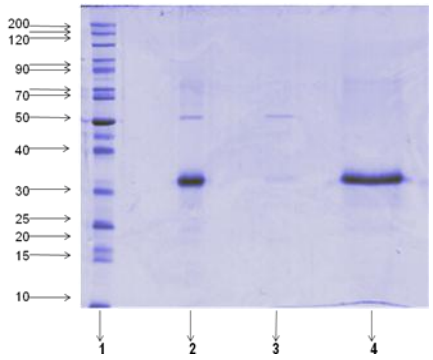


***Figura 19**. Electroforesis SDS-PAGE del extracto crudo y purificado de TLL. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Extracto crudo de TLL. Carril 3: Sobrenadante del curso de inmovilización. Carril 4: TLL adsorbida en soportes de octil agarosa.*

Por otra parte, las figuras 20 y 21 representan la cinética de inmovilización sobre soportes de octil agarosa de las enzimas Cal-B y TLL, respectivamente. Durante el curso de inmovilización, se observó que la Cal-B es hiperactivada en un factor de 1.5 veces en la medida que es adsorbida en el soporte hidrofóbico. Por su parte, la TLL es hiperactivada en un factor de aproximadamente 3 veces.

Con anterioridad, se ha reportado que la Cal-B, en contraste con muchas otras lipasas, parece estar bastante rígida y muestra un leve efecto de activación interfacial, lo que la convierte en una especie intermedia entre una esterasa y una lipasa típica (Pérez y Moreno, 2006; Martinelle *et al*; 1995). Por lo tanto, es posible que Cal-B presente una pequeña región de tapadera que regula y permite un mejor acceso al centro activo, de ahí que la lipasa muestre una actividad similar en presencia de la interfase hidrofóbica como en solución acuosa.

En este contexto, aunque todas las lipasas exhiben un grado sorprendente de similitud estructural y funcional, pequeñas variaciones

en la estructura del centro activo y/o lid, pueden tener grandes efectos en las propiedades de las mismas.

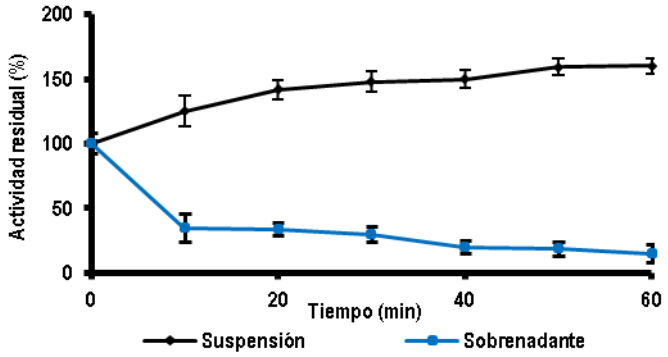


Figura 20. *Curso de inmovilización de la Cal-B sobre soportes de octil agarosa. La actividad en la suspensión y el sobrenadante fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4 mM) a pH 7, 25 mM y 25ºC.*

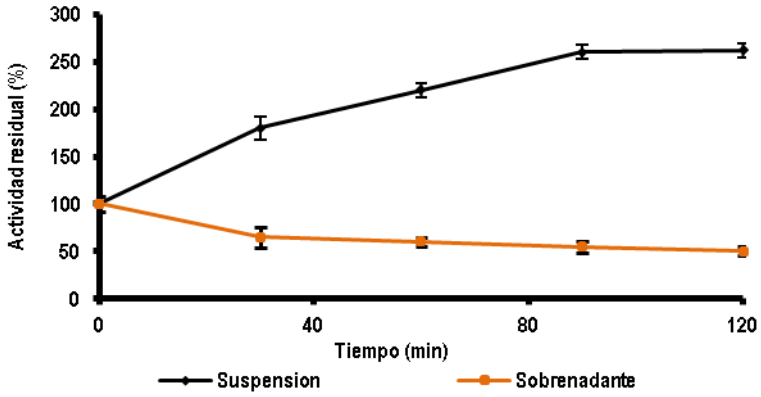


Figura 21. *Curso de inmovilización de la TLL sobre soportes de octil agarosa. La actividad en la suspensión y el sobrenadante fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4 mM) a pH 7, 25mM y 25ºC.*

Una vez que la Cal-B y TLL se encontraban en fase sólida, es decir inmovilizadas en soportes hidrofóbicos de octil agarosa, se procedió a la modificación química por reacciones de aminación y succinilación.

3.2. Estudio del efecto de la modificación química en fase sólida por reacciones de aminación sobre las propiedades de la Cal-B y la TLL inmovilizadas en octil agarosa

Cal-B y TLL presentan un gran número de aminoácidos en su estructura proteica que pueden ser fácilmente modificados mediante reacciones químicas. La modificación de los residuos aminoacídicos externos en la superficie de la proteína (Lys, Asp y Glu) puede alterar en gran medida las propiedades de la enzima (Davis, 2003; Carraway *et al;* 1972).

Los agentes modificantes utilizados para la modificación química de Cal-B y TLL inmovilizadas en soportes de octil agarosa fueron: etilendiamina y anhídrido succínico. Estos permiten la modificación de los aminoácidos ácidos, tales como aspártico y glutámico, mediante reacciones de aminación y de aminoácidos básicos como la lisina por reacciones de succinilación (Davis, 2003; Palomo *et al;* 2007; Hoare y Koshland, 1966).

Durante el desarrollo de esta investigación se evaluó el efecto de la modificación química por reacciones de aminación y succinilación a diferentes extensiones (10, 50 y 100%), sobre la movilidad electroforética, la actividad enzimática (usando como sustrato p-NPB) y la estabilidad de las lipasas de Cal-B y TLL.

La modificación química total de los residuos ácidos en la superficie de las enzimas por reacciones de aminación ha sido ampliamente reportada (Carraway y Koshland, 1972, Rodrigues *et al;* 2009). Sin embargo, para la modificación parcial de los ácidos aspártico y

glutámico aún no se encuentra una amplia gama de referencias. En este sentido, fue inicialmente necesario encontrar la concentración de carbodiimida (DEC) adecuada para la activación de los grupos carboxílicos presentes en la superficie de la proteína que permitiera la modificación parcial con etilendiamina de los residuos aminoacídicos de ácido aspártico y glutámico.

De acuerdo con lo anterior, y según se reporta en la tabla 3, fueron evaluadas diferentes concentraciones de carbodiimida (DEC), con las que se alcanzó los niveles de modificación deseados (10, 50 y 100%). La titulación de los grupos amino libres con TNBS permitió determinar el grado de modificación de la Cal-B y la TLL (Snyder y Sobocinsky, 1975; Carraway y Koshland, 1972).

Tabla 3. *Efecto de la concentración de carbodiimida sobre el grado de modificación de la Cal-B y TLL por reacciones de aminación química. Condiciones de modificación: EDA 1M, pH 4.75.*

Concentración de DEC (mM)	Modificación (%)
10	**>95**
1	**50**
0.2	**10**

3.2.1. Efecto de la modificación química por reacciones aminación sobre las propiedades de la Cal-B inmovilizada en soportes de octil agarosa

Teniendo en cuenta los grandes cambios conformacionales que sufren las lipasas y el gran número de fuerzas que implican el mantenimiento de las diferentes conformaciones, el centro activo de la enzima puede ser fácilmente alterable, con lo que se podría conseguir modular las propiedades de la lipasa con relativa facilidad (Bastida *et al;* 1998). En

este contexto, para llevar a cabo cualquier tipo de modificación química, es importante conocer las zonas de la superficie de la enzima posiblemente implicadas en la modificación y su relación con el centro activo y la tapadera o lid el cual es un segmento característico en las lipasas, cuyos movimientos darán lugar a una u otra conformación en la enzima.

El centro activo de la Cal-B está constituido por los residuos de ser-105 (azul), his-224 y asp-187 (Uppengberg *et al;* 1994; Perez y moreno, 2006). Cal-B presenta en su estructura primaria, 14 residuos de ácido aspártico (verde) y 4 residuos de ácido glutámico (violeta), los cuales son aminoácidos blanco en las reacciones de modificación química con etilendiamina (Davis, 2003). De acuerdo con la figura 22 algunos de estos residuos se encuentran ubicados en la proximidad del lid. Cal-B presenta además, 9 residuos de tirosina (naranja) que resultarían afectados en este tipo de modificación (Gilles *et al;* 1990; Alcalde, 1999). Sin embargo, la mayoría de estos residuos están ubicados en la cara posterior al centro activo y al lid.

La distribución de los residuos aminoacídicos y su cercanía con el centro activo y el lid (amarillo) o tapadera se muestra en la figura 22. El conocimiento de la distribución de los residuos aminoacídicos en la superficie de la enzima permitió dar una explicación aproximada de los efectos de la modificación química que se describen a continuación.

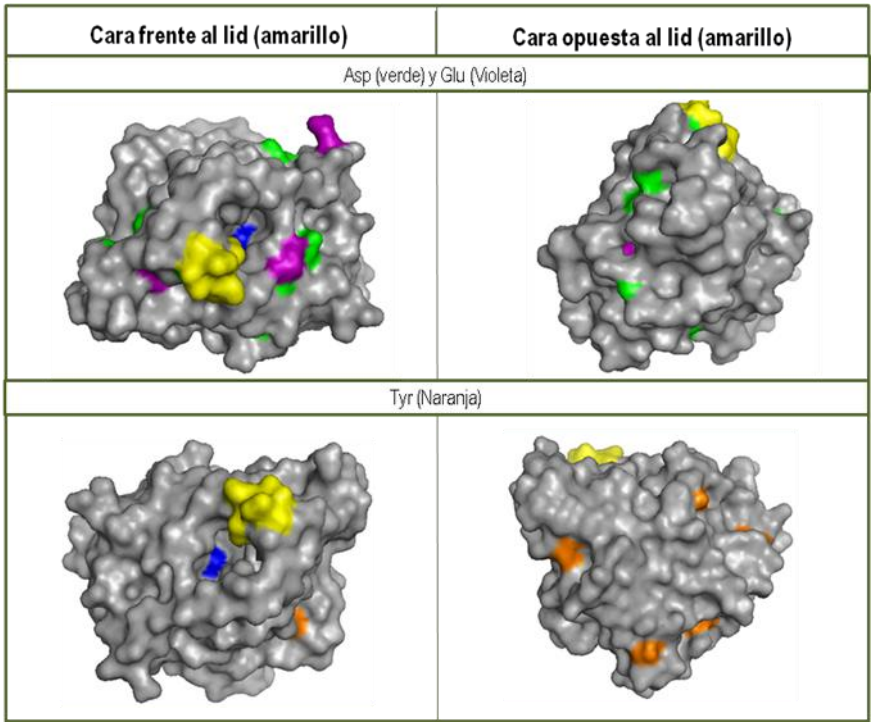


Figura 22. *Estructura tridimensional de la lipasa de Candida antarctica B (Estructura 3D obtenida de la base de datos PDB. Software visualizador utilizado PYMOL viewer versión 0.99. El código de PDB 1TCA.Codigo de colores: centro activo (azul), lid o tapadera (amarillo), acido aspártico (verde), ácido glutámico (violeta), tirosina (naranja).*

- ***Caracterización electroforética de los derivados de Cal-B aminados inmovilizados en octil agarosa***

Los derivados de Cal-B inmovilizados en soportes de octil agarosa sin modificar, modificados por reacciones de aminación y los derivados aminados cuyos residuos de tirosina fueron recuperados mediante la incubación en hidroxilamina, fueron caracterizados por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y bajo condiciones nativas (PAGE-Nativa). El análisis por técnicas electroforéticas fue posible debido a que: la modificación química por reacciones de aminación

genera un cambio en la carga neta de la proteína y por tanto una alteración en su punto isoeléctrico (pI). De esta manera, al aumentar el grado de modificación, la densidad de carga positiva sobre la superficie de la proteína se hace mayor y el punto isoeléctrico aumenta consecuentemente. Este efecto fue evidente en la electroforesis bajo condiciones nativas donde las proteínas migran de acuerdo con su carga y forma.

La figura 23(a) correspondiente a la electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes, demuestra que el grado de modificación química no ejerce un cambio significativo sobre el peso final de la proteína. Sin embargo, bajo condiciones nativas, según se muestra en la figura 23(b), se observó un cambio significativo en la movilidad de las proteínas modificadas, producto de la carga neta de la lipasa que hace que ésta sea retenida en mayor proporción, en la medida que su carga positiva es incrementada por causa de la modificación.

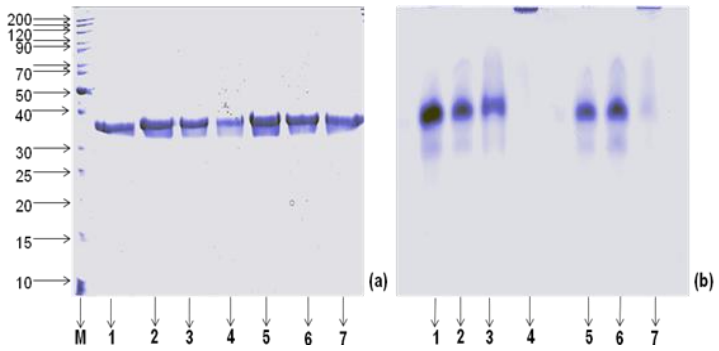


Figura 23. *(a) Electroforesis SDS-PAGE y PAGE-Nativa (b) de los derivados modificados de Cal-B. Carril M: Marcador de peso molecular, Carril 1: CalB-octil no modificada, Carril 2: CalB-A-10%, Carril 3: CalB-A-50%, Carril 4: CalB-A-100%, Carril 5: CalB-H-10%, Carril 6: CalB-H-50%, Carril 7: CalB-H-100%*

- ***Efecto de la modificación química por reacciones de aminación, sobre la actividad hidrolítica frente al p-NPB de la Cal-B inmovilizada en soportes de octil agarosa***

La actividad hidrolítica frente al p-NPB de los diferentes derivados enzimáticos de Cal-B inmovilizada sobre soportes de octil agarosa sin modificar (Cal-B-Octil), de los derivados modificados por reacciones de aminación (Cal-B-A-10%, Cal-B-A-50%, Cal-B-A-100%) y de los derivados aminados cuyos residuos de tirosina habían sido recuperados (Cal-B-H-10%, Cal-B-H-50%, Cal-B-H-100%) se registra en la Tabla 4. En el caso de los derivados modificados por aminación se observa que la modificación parcial de Cal-B (10% y 50%) no ejerce un cambio significativo en la actividad hidrolítica de la lipasa. Sin embargo, cuando la enzima es modificada al 100% se logra aumentar la actividad de la lipasa en un 13,5% en comparación a la Cal-B inmovilizada en octil agarosa sin modificar.

Aunque, los efectos de la modificación química sobre las propiedades de las enzimas pueden ser complejos de predecir y pueden estar limitados por las condiciones experimentales (Khajeh *et al,* 2001; Rodrigues *et al;* 2011). De acuerdo con la distribución de los residuos ácidos (Asp y Glu) en la superficie de la Cal-B mostrados en la figura 22, es posible considerar que al modificar la lipasa de forma parcial (10% y 50%) solo hayan sido alterados los residuos ubicados lejos de la proximidad del centro activo y/o el lid. En consecuencia, es posible que la actividad enzimática de la lipasa no fuera alterada por efecto de la modificación química.

Por otra parte, al modificar de manera completa los residuos ácidos de la superficie de la Cal-B, es posible que hayan sido tocados los dos residuos de ácido glutámico próximos al lid, provocando cambio en el

equilibrio conformacional de la lipasa que conllevó a una mayor disponibilidad en el centro activo y por tanto un aumento en la actividad enzimática (Cabrera *et al*; 2009).

Tabla 4. *Actividad enzimática de los derivados de Cal-B modificados por reacciones de aminación. Condiciones de ensayo: La actividad fue determinada usando como sustrato p-NPB 0,4mM en buffer fosfato pH 7, 25mM a 25ºC*

Derivados aminados	**Cal-B-octil**	**CalB-A-10%**	**CalB-A-50%**	**CalB-A-100%**
Actividad (U/g)	13.6	13.6	13.6	15.5
Derivados aminados Tratados con hidroxilamina		**CalB-H-10%**	**CalB-H-50%**	**CalB-H-100%**
Actividad (U/g)		12.7	13.9	15.1

Por otra parte, la recuperación de los residuos de tirosina de los derivados de Cal-B modificados por reacciones de aminación, ejerció un efecto poco significativo en la actividad enzimática de las preparaciones aminadas de Cal-B. De acuerdo con la figura 22, la mayoría de los residuos de tirosina están ubicados en la cara opuesta al lid y lejos de la proximidad del centro activo, por lo que es posible considerar que su alteración no interfiera de manera significativa en la actividad de la lipasa.

- ***Estudio del efecto de la modificación química por reacciones de aminación sobre la estabilidad térmica y frente a solventes orgánicos de la Cal-B inmovilizada en soportes de octil agarosa***

- **Efecto de la modificación química sobre la estabilidad térmica de los derivados modificados de Cal-B inmovilizados en soportes de octil agarosa**

El efecto de la modificación química por aminación sobre la estabilidad térmica de la Cal-B inmovilizada en octil agarosa fue evaluado a 70ºC y pH 7. Inicialmente, la temperatura de ensayo (70ºC) provoca la desorganización de la envoltura acuosa de la proteína y la destrucción de interacciones débiles que conllevan a la desnaturalización de la estructura secundaria de la enzima (Arroyo, 1995).

En la figura 24 se muestra los resultados obtenidos durante el curso de inactivación térmica para la Cal-B inmovilizada en soportes de octil agarosa sin modificar (Cal-B-Octil) y para la lipasa modificada de forma parcial (Cal-B-A-10%, Cal-B-A-50%), y totalmente aminada (Cal-B-A-100%). Además, muestra el curso de inactivación térmica para los derivados modificados cuyos residuos de tirosina fueron recuperados (Cal-B-H-10%, Cal-B-H-50%, Cal-B-H-100%) por tratamiento con hidroxilamina.

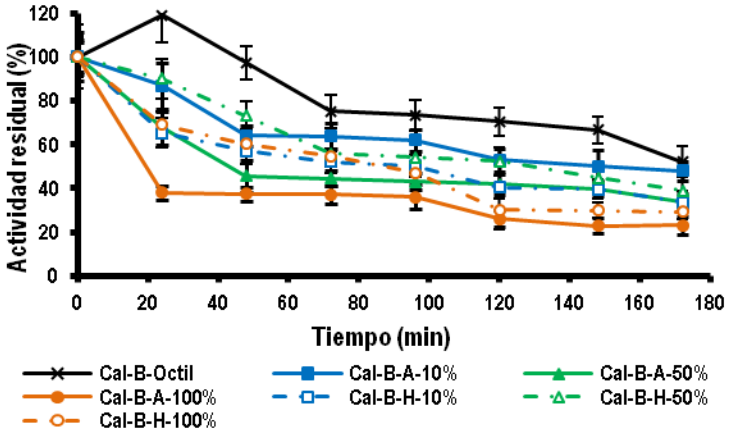


Figura 24. *Curso de inactivación térmica a 70ºC de los derivados modificados y sin modificar de la lipasa de Cal-B. La actividad enzimática fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4mM) en buffer fosfato pH7, 25mM a 25 ºC.*

Bajo las condiciones de inactivación térmica a 70ºC, el derivado de Cal-B inmovilizado en soportes de octil agarosa sin modificar, fue más estable que los demás derivados que habían sido modificados por reacciones de aminación. De los derivados modificados de Cal-B en fase sólida, el menos estable fue el derivado modificado al 100% (Cal-B-A-100%), el cual registró una pérdida de actividad hidrolítica de más del 50% en los primeros 20 minutos del curso de inactivación.

Por su parte, los derivados modificados al 10 y 50% registraron una pérdida del 50% de actividad después de los 40 y 120 minutos del curso de inactivación, respectivamente. En este sentido, la modificación química por reacciones de aminación provoca la desestabilización de la Cal-B inmovilizada en octil agarosa bajo las condiciones de inactivación térmica.

De acuerdo con lo anterior y bajo las condiciones de ensayo (70ºC, pH 7) es posible considerar que la completa modificación de los grupos carboxílicos de la superficie de la proteína, ejerce un efecto negativo en la estabilidad frente a la temperatura de la Cal-B inmovilizada en soportes de octil agarosa. Teniendo en cuenta que la modificación química por reacciones de aminación, permite el cambio de un grupo que bajo estas condiciones se hallaba cargado negativamente (COO^-) por un nuevo grupo que bajo las mismas condiciones es de carga positiva ($^+NH_3$), es posible considerar que las nuevas fuerzas repulsivas y la generación de nuevas interacciones, alteran la conformación de la enzima, modificado su estabilidad (Carraway *et al;* 1972). En este contexto, es posible que la modificación química de la Cal-B elimine puentes iónicos de gran importancia en el mantenimiento de la estructura activa de la lipasa, lo que conlleva a la rápida desnaturalización de la enzima bajo las condiciones de inactivación del ensayo.

Por otra parte, los derivados de Cal-B inmovilizados en soportes de octil agarosa modificados por reacciones de aminación cuyos residuos de tirosina habían sido recuperados, mostraron una mayor estabilidad en comparación a los derivados modificados no recuperados. Por ejemplo, el derivado modificado al 100% con los residuos de tirosina recuperados (Cal-B-H-100%), conservó más del 50% de su actividad hidrolítica durante la primera hora del curso de inactivación, en comparación a la Cal-B modificada al 100% cuyos residuos de tirosina no habían sido recuperados (Cal-B-A-100%), la cual registró una pérdida de actividad de más del 50% en los primeros 20 minutos del curso de inactivación. El mismo efecto fue observado para la Cal-B modificada al 50% con residuos de tirosina recuperados y sin recuperar.

De acuerdo con lo anterior, es posible que la recuperación de los residuos de tirosina en la Cal-B inmovilizada en soportes de octil agarosa y modificada por reacciones de aminación, permita la restauración de interacciones de tipo puentes de hidrógeno que hacen que estos derivados modificados sean notoriamente más estables en comparación a aquellos derivados modificados cuyos residuos de tirosina no habían sido recuperados.

- **Efecto de la modificación química sobre la estabilidad frente a solventes orgánicos de los derivados modificados de Cal-B inmovilizados en soportes de octil agarosa**

El efecto de la modificación química por reacciones de aminación sobre la estabilidad frente a solventes orgánicos de la Cal-B inmovilizada en soportes de octil agarosa, fue evaluada en presencia de Tetrahidrofurano al 50%(v/v), bajo condiciones de pH neutro a 25ºC.

Teniendo en cuenta que el ambiente acuoso es el medio natural de las enzimas, es evidente que ante la presencia de un solvente orgánico, éstas tienden a adoptar una conformación inversa a su estado natural. De manera que sus propiedades podrían ser alteradas por efecto del solvente orgánico (Branden y Tooze, 1991; Arroyo, 1995). THF es un solvente medianamente polar aprótico, por su naturaleza podría restringir la flexibilidad de la enzima en el medio de reacción, y causar notorias pérdidas de actividad. Por otra parte, al ser un solvente medianamente polar, miscible en agua, causa un efecto de inactivación al eliminar las moléculas de agua que son esenciales para la que la enzima mantenga su estructura activa (Bellezza *et al;* 2009; Wang *et al;* 2011).

En la figura 25 se muestran los resultados del curso de inactivación enzimática en presencia de THF para Cal-B inmovilizada en soportes de octil agarosa sin modificar (Cal-B-Octil) y para la lipasa modificada de forma parcial (Cal-B-A-10%, Cal-B-A-50%) y completa por reacciones de aminación (Cal-B-A-100%). Además, muestra el curso de inactivación en presencia de solvente orgánico (THF) para los derivados modificados cuyos residuos de tirosina fueron recuperados mediante su incubación en hidroxilamina (Cal-B-H-10%, Cal-B-H-50%, Cal-B-H-100%).

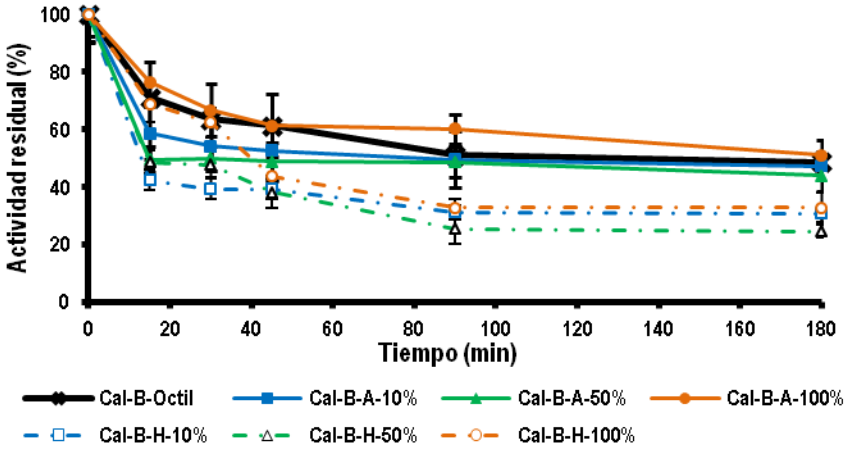


Figura 25. *Curso de inactivación en presencia de solvente orgánico (THF 50%(v/v)) de los derivados modificados y sin modificar de la lipasa de Cal-B. La actividad fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4mM) en buffer fosfato pH7, 25mM a 25 ºC.*

Bajo la condiciones de inactivación en presencia de solvente orgánico los derivados más estables fueron el derivado de Cal-B inmovilizado en soportes de octil agarosa sin modificar y el derivado de Cal-B inmovilizado en soportes de octil agarosa modificado al 100% (Cal-B-A-100%), los cuales conservaron más del 65% de su actividad hidrolítica durante los primeros 30 minutos del curso de inactivación frente al

solvente orgánico. Adicionalmente, los derivados de Cal-B inmovilizados en soportes de octil agarosa, modificados de forma parcial al 10 y 50% (Cal-B-A-10%, Cal-B-A-50%) conservaron más del 50% de su actividad catalítica durante el mismo tiempo.

Por otra parte, los derivados de Cal-B inmovilizados en soportes de octil agarosa, modificados por reacciones de aminación cuyos residuos de tirosina habían sido recuperados, registraron una menor estabilidad en comparación a los derivados cuyos residuos de tirosina no habían sido recuperados. En promedio, los primeros fueron 1.2 veces menos estables que los derivados modificados, sin recuperar este tipo de residuos aminoacídicos.

De acuerdo con lo anterior, y teniendo en cuenta el marcado efecto del solvente orgánico sobre la estabilidad de la lipasa, es posible considerar que la modificación química por reacciones de aminación provocó cambios desfavorables en la superficie de la Cal-B, alterando la conformación de la misma y modificando así sus propiedades.

3.2.2. Efecto de la modificación química por reacciones aminación sobre las propiedades de la TLL inmovilizada en soportes de octil agarosa

La lipasa de *Thermomyces lanuginosus (TLL)* difiere de la Cal-B, tanto en la proporción de residuos aminoacídicos disponibles para la modificación química, como en la ubicación de los mismos en la superficie de la proteína (Alcalde, 1999). Por lo que es posible que un mismo tipo de modificación pueda causar efectos diferentes en una u otra lipasa. En este sentido, fue estudiado el efecto de la modificación química por reacciones de aminación sobre las propiedades de la TLL.

TLL presenta en su estructura primaria 19 residuos de ácido aspártico (gris), 12 de ácido glutámico (rojo), los cuales son aminoácidos clave en la modificación química por reacciones de aminación (Davis; 2003). TLL presenta además, 10 residuos de tirosina que resultarían afectados en este tipo de modificación. En la figura 26 se observa la distribución de los residuos aminoacídicos sobre la superficie de la TLL. A diferencia de la Cal-B, TLL posee tres residuos aminoacídicos de tirosina en una posición muy cercana al centro activo y al lid o tapadera (Tyr-261, 171, 21). La distribución de los residuos aminoacídicos y su cercanía con el centro activo y el lid (naranja) se muestran en la figura 26. El centro activo de la TLL está formado por los residuos de ser-146(azul), his-228 y asp-201 (Allan, 2000; Alcalde, 1999).

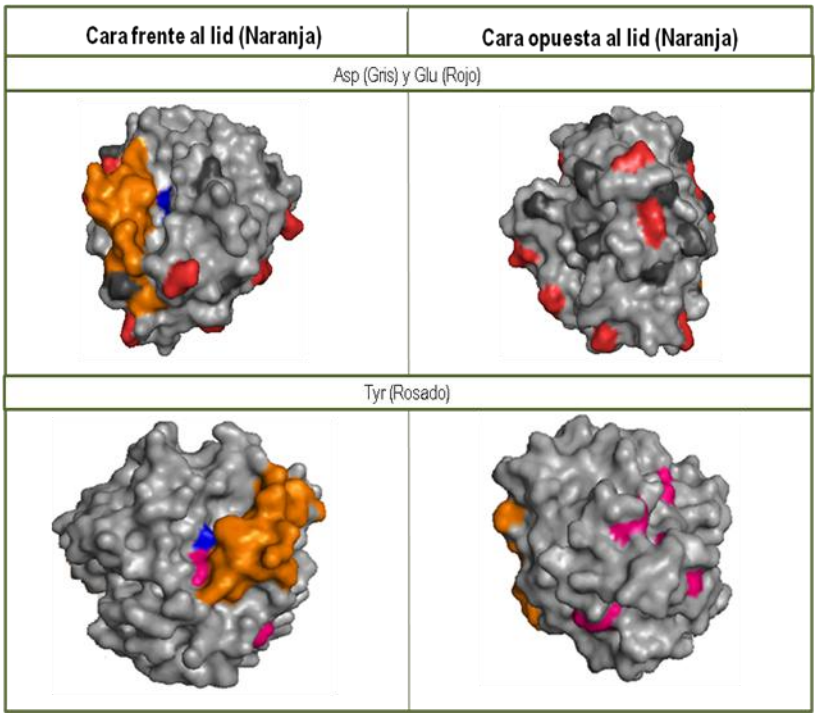


Figura 26. *Estructura tridimensional de la lipasa de Thermomyces lanuginosus (Estructura 3D obtenida de la base de datos PDB. Software*

visualizador utilizado PYMOL viewer versión 0.99. El código de PDB 1DTE. Codigo de colores: centro activo (azul), lid o tapadera (Naranja), acido aspártico (gris oscuro), ácido glutámico (rojo), tirosina (rosado).

- ***Caracterización electroforética de los derivados de TLL aminados inmovilizados en octil agarosa***

La figura 27 muestra el perfil electroforético de los derivados de la TLL inmovilizados en soportes de octil agarosa sin modificar (TLL-Octil), modificados por reacciones de aminación en fase sólida (TLL-A-10%, TLL-A-50%, TLL-A-100%) y de los derivados aminados cuyos residuos de tirosina fueron recuperados mediante la incubación en hidroxilamina (TLL-H-10%, TLL-H-50%, TLL-H-100%).

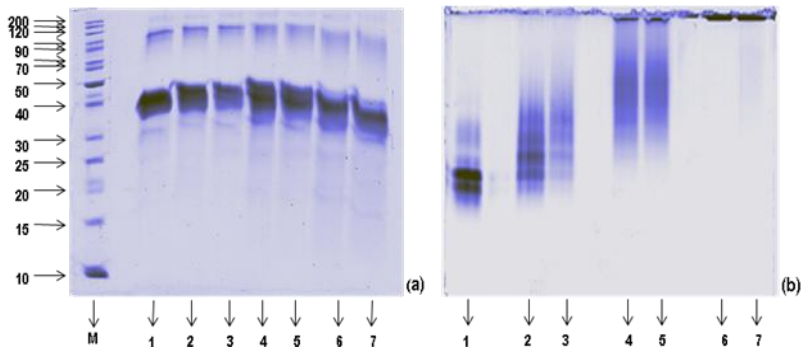


Figura 27. (a) *Electroforesis SDS-PAGE y PAGE-Nativa* ***(b)*** *de los derivados modificados de TLL. Carril M: Marcador de peso molecular, Carril 1: TLL no modificada, Carril 2: TLL-A-10%, Carril 3: TLL-H-10%, Carril 4: TLL-A-50%, Carril 5: TLL-H-50%, Carril 6: TLL-A-100, Carril 7: TLL-H-100%*

De acuerdo con la figura 27(a) la modificación química no conlleva a reacciones intermoleculares, ya que se observa en todos los casos la banda característica de la TLL a 30 KDa. Sin embargo, bajo

condiciones nativas como se registra en la figura 27(b), se observó un cambio significativo en la movilidad electroforética de las proteínas modificadas y sin modificar. Este efecto es atribuido a la carga neta que éstas presentan una vez han sido modificadas por reacciones de aminación. La recuperación de los residuos de tirosina no causo un efecto significativo en la movilidad electroforética de las proteínas modificadas (Galvis *et al;* 2011).

- ***Efecto de la modificación química por reacciones de aminación, sobre la actividad hidrolítica frente al p-NPB de la TLL inmovilizada en soportes de octil agarosa***

La actividad hidrolítica frente al p-NPB de los diferentes derivados de TLL inmovilizados sobre soportes de octil agarosa sin modificar (TLL-Octil), de los derivados modificados por reacciones de aminación (TLL-A-10%, TLL-A-50%, TLL-A-100%) y de los derivados aminados cuyos residuos de tirosina habían sido recuperados (TLL-H-10%, TLL-H-50%, TLL-H-100%) se registra en la Tabla 5.

Tabla 5. *Actividad enzimática de los derivados de TLL modificados por reacciones de aminación. Condiciones de ensayo: La actividad enzimática fue determinada usando como sustrato p-NPB 0,4mM en buffer fosfato pH 7, 25mM a 25ºC*

Derivados aminados	**TLL-Octil**	**TLL-A-10%**	**TLL-A-50%**	**TLL-100%**
Actividad (U/g)	52	51	53	57
Derivados aminados Tratados con hidroxilamina		**TLL-10%**	**TLL-50%**	**TLL-100%**
Actividad (U/g)		52	53	60

De acuerdo con la tabla 5, la modificación parcial (TLL-A-10%, TLL-A-50%) provocó un efecto poco significativo sobre la actividad de la lipasa. Sin embargo, la modificación total (TLL-A-100%) de los residuos de ácido aspártico y glutámico en la superficie de la TLL por reacciones de aminación, provoca un incremento en la actividad de la lipasa de aproximadamente el 10% en relación a la enzima no modificada.

Teniendo en cuenta que la modificación química por reacciones de aminación ocurre de una manera inespecífica sobre los residuos aminoacídicos ácidos de la superficie de la proteína, es posible que la modificación total en la superficie de la TLL haya tocado los residuos de ácido aspártico y glutámico próximos al lid y al centro activo (figura 26) haciendo que el equilibrio conformacional de la lipasa sea alterado provocando una mejoría en la actividad de la enzima (Cabrera *et al*; 2009).

Por otra parte, la recuperación de los residuos de tirosina de la TLL modificada al 100% (TLL-H-100%) provocó un aumento en la actividad de la lipasa en aproximadamente el 15% en comparación a la enzima no modificada y fue un 5% más activa en comparación a la enzima modificada al 100% en donde los residuos de tirosina aun no habían sido recuperados (TLL-A-100%) (Galvis *et al;* 2011).

En este sentido, la modificación química por reacción de aminación causó un efecto positivo en la actividad de la TLL. Este tipo de modificación química fue posteriormente utilizado como una estrategia novedosa para la preparación de agregados enzimáticos entrecruzados CLEAs, en la que los nuevos grupos amino facilitan el entrecruzamiento de la lipasa por la acción de un agente entrecruzante como el glutaraldehído (Wilson *et al;* 2006; Migneault *et al;* 2004).

- ***Estudio del efecto de la modificación química por reacciones de aminación sobre la estabilidad térmica y frente a solventes orgánicos de la TLL inmovilizada en soportes de octil agarosa***

- **Efecto de la modificación química sobre la estabilidad térmica de los derivados modificados de TLL inmovilizados en soportes de octil agarosa**

La estabilidad de las diferentes preparaciones de TLL, modificadas (TLL-A-10%, TLL-A-50%, TLL-A-100%, TLL-H-10%, TLL-H-50%, TLL-H-100%) y sin modificar (TLL-Octil) fue evaluada a 70ºC, bajo condiciones de pH neutro. El curso de inactivación térmica se muestra en la figura 28.

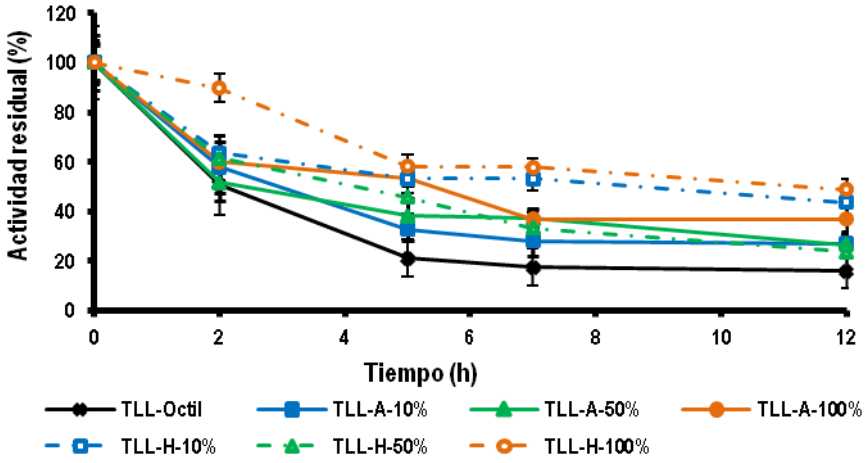


Figura 28. *Curso de inactivación térmica a 70ºC de los derivados modificados y sin modificar de la TLL. La actividad fue determinada frente a la hidrólisis del p-NPB (0.4mM) en buffer fosfato pH7, 25mM a 25 ºC.*

Bajo las condiciones de inactivación, se observó que la modificación química por reacciones de aminación provocó un aumento en la

estabilidad de la TLL inmovilizada en octil agarosa. La figura 28 registra que todos los derivados modificados por reacciones de aminación, fueron más estables que la enzima sin modificar (TLL-Octil). Por ejemplo, el derivado modificado al 100% cuyos residuos de tirosina habían sido recuperados (TLL-H-100%) conservó más del 50% de actividad catalítica por más de 10 horas, en comparación a la enzima sin modificar que perdió cerca del 50% de actividad durante las primeras 2 horas del curso de inactivación.

De acuerdo con lo anterior, la modificación química y la recuperación de los residuos de tirosina, conllevó a un aumento en la estabilidad de la TLL inmovilizada en soportes de octil agarosa. En este sentido, es posible que la modificación química haya dado lugar a nuevas interacciones iónicas o de tipo puentes de hidrógeno, haciendo que la proteína sea estabilizada.

- **Efecto de la modificación química sobre la estabilidad frente a solventes orgánicos de los derivados modificados de TLL inmovilizados en soportes de octil agarosa**

La estabilidad frente a solventes orgánicos de los derivados modificados y sin modificar de TLL fue evaluada a pH 7 en un medio que contenía 50% de Tetrahidrofurano (THF). El curso de inactivación se muestra en la figura 29.

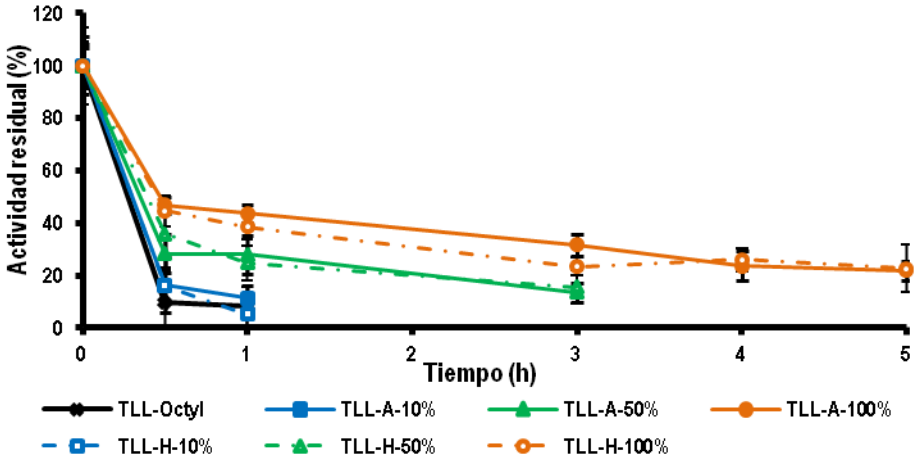


Figura 29. *Curso de inactivación en presencia de solvente orgánico (THF) de los derivados modificados y sin modificar de la lipasa de TLL. La actividad fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4mM) en buffer fosfato pH7, 25mM a 25 ºC.*

En ella se observa que bajo las condiciones de inactivación por solvente orgánico, el derivado de TLL inmovilizado en octil agarosa sin modificar, perdió aproximadamente el 90% de actividad en los primeros 30 minutos del curso de inactivación. Las preparaciones modificadas a bajos niveles TLL-A-10% y TLL-A-50% presentaron la misma tendencia que la enzima sin modificar. Sin embargo, TLL modificada al 100% (TLL-A-100%) y la contraparte modificada, cuyos residuos de tirosina fueron recuperados (TLL-H-100%) por tratamiento con hidroxilamina, registraron una mayor estabilidad en comparación a la enzima no modificada al conservar más del 20% de actividad aun después de 3 horas del curso de inactivación por THF.

De acuerdo con lo anterior, la modificación química confiere a la lipasa de TLL una mayor estabilidad frente a la acción de la temperatura y de solventes orgánicos como THF. En este sentido, es probable que ante

la modificación química se favorezcan interacciones iónicas o puentes de hidrógeno que conlleven a un aumento en la estabilidad de la TLL.

3.2.3 Efecto de la modificación química por reacciones de aminación sobre la estabilidad de diferentes lipasas microbianas

En la Tabla 6, se registra el tiempo de vida media para cada uno de los derivados de Cal-B y TLL inmovilizados en soportes de octil agarosa, sin modificar y modificados por reacciones de aminación química con etilendiamina. El tiempo de vida media mide el cambio del estado nativo de las proteínas al desplegado en procesos de desactivación bajo condiciones determinadas.

Tabla 6. *Efecto de la aminación sobre el tiempo de vida media, de los diferentes derivados de Cal-B y TLL inmovilizados en soportes de octil agarosa bajo diferentes condiciones de inactivación*

Tiempo de vida media (h)					
Condiciones de inactivación			Condiciones de inactivación		
Derivados Cal-B	70ºC pH 7	50% THF pH 7	Derivados TLL	70ºC pH 7	50% THF pH 7
Cal-B-Octil	2.9	1.5	**TLL-Octil**	1.8	0.07
CalB-A-10%	2.5	0.8	**TLL-A-10%**	3	0.08
CalB-H-10%	1.6	0.2	**TLL-H-10%**	7	0.08
CalB-A-50%	0.7	0.3	**TLL-A-50%**	3.5	0.3
CalB-H-50%	2	0.2	**TLL-H-50%**	7	0.35
CalB-A-100%	0.3	3	**TLL-A-100%**	5	0.4
CalB-H-100%	1.5	0.7	**TLL-H-100%**	11	0.4

Aunque Cal-B y TLL pertenecen al mismo grupo de enzimas, las figuras 22 y 26 evidencian que éstas presentan una estructura tridimensional y

una distribución superficial de los residuos aminoacídicos muy diferentes entre sí. La aminación química de las enzimas provoca una alteración drástica en la carga neta de la proteína y en las interacciones iónicas que ocurren entre los grupos de la superficie de la enzima. Estos cambios podrían modular los movimientos que sufre el lid o tapadera durante la catálisis (Cabrera *et al*; 2009; Galvis *et al;* 2011). En este contexto, puede esperarse cambios en las propiedades de las lipasas y estos podrían variar entre una u otra lipasa.

Para la lipasa de *Candida antarctica B,* la modificación química por reacciones de aminación provocó un efecto desfavorable sobre la estabilidad de la enzima, sometida al curso de inactivación térmica a 70ºC. Todos los niveles de modificación causaron disminución en la estabilidad de la lipasa.

Por otra parte, bajo condiciones de inactivación por solvente orgánico, las modificaciones parciales de la lipasa de Cal-B causaron una notable disminución en la estabilidad de la enzima. Sin embargo, la completa modificación de los grupos ácidos (Asp, Glu) en la superficie de la proteína, permitió un aumento en la estabilidad de la enzima modificada (Cal-B-A-100%) en un factor de 2 veces en comparación con la enzima no modificada (Cal-B-octil).

En el caso de la lipasa de TLL, la modificación parcial y completa por reacciones de aminación, conllevó a un aumento en la estabilidad de la enzima bajo las diferentes condiciones de inactivación estudiadas. Por ejemplo, la modificación completa de los residuos ácidos en la superficie de la lipasa de la TLL causó un aumento en la estabilidad de aproximadamente 6 veces en comparación a la enzima no modificada,

cuando estas fueron sometidas a procesos de inactivación térmica a 70ºC.

En este contexto, la modificación química por reacciones de aminación permite la modulación de las propiedades de actividad y estabilidad de las lipasas microbianas de Cal-B y TLL. Los efectos difieren entre una u otra lipasa.

3.3 Estudio del efecto de la modificación química en fase sólida por reacciones de succinilación sobre las propiedades de la Cal-B y la TLL inmovilizadas en octil agarosa

Aunque los grupos ácidos (Asp y Glu) son los que más abundan en la superficie de la proteína y pueden ser fácilmente modificados por reacciones de aminación, los residuos de lisina presentes en la superficie también pueden ser modificados por reacciones de succinilación utilizando anhídrido succínico como agente modificante. En esta ocasión también fue necesario encontrar la concentración de anhídrido succínico adecuada para alcanzar niveles de modificación parcial, es decir, al 10 y 50%. Los resultados se reportan en la Tabla 7. La titulación de los grupos amino libres con TNBS permitió determinar el grado de modificación de la Cal-B y la TLL (Snyder y Sobocinsky, 1975).

***Tabla 7**. Efecto de la concentración de anhídrido succínico sobre el grado de modificación de la Cal-B y TLL por reacciones de succinilación química. Condiciones de modificación: buffer fosfato 50mM, pH 8.*

Concentración de anhídrido succínico (mM)	Modificación (%)
100	>95
20	50
0.1	10

3.3.1. Efecto de la modificación química por reacciones succinilación sobre las propiedades de la Cal-B inmovilizada en soportes de octil agarosa

Cal-B también presenta en su estructura primaria 9 aminoácidos básicos como la lisina, que pueden ser modificados por reacciones de succinilación. Su distribución en la superficie de la lipasa y su cercanía con el lid (amarillo) y el centro activo se muestra en la figura 30.

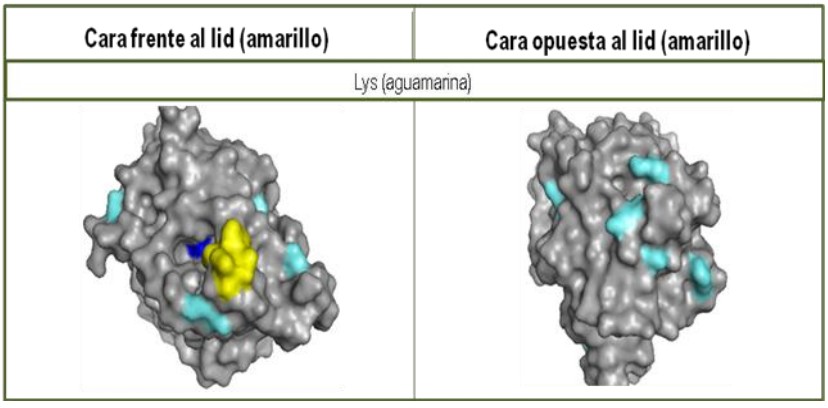


***Figura 30.** Estructura tridimensional de la lipasa de Candida antarctica B (Estructura 3D obtenida de la base de datos PDB. Software visualizador utilizado PYMOL viewer versión 0.99. El código de PDB*

1TCA. Código de colores: centro activo (azul), lid o tapadera (amarillo), residuos de lisina (aguamarina).

En esta figura se observa que la mayoría de los residuos de lisina están ubicados en la cara posterior al lid. Sin embargo, aproximadamente 2 de estos residuos están ubicados en la proximidad del lid o tapadera y su alteración podría generar cambios en la propiedades de la lipasa.

- ***Caracterización electroforética de los derivados de Cal-B succinilados inmovilizados en octil agarosa***

La caracterización electroforética bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y nativas (PAGE-Nativa), de los derivados de Cal-B inmovilizados en soportes de octil agarosa sin modificar (CalB-Octil) y modificados por reacciones de succinilación (CalB-S-10%, CalB-S-50%, CalB-S-100%), mostró que este tipo de modificación no conlleva a reacciones intermoleculares, de manera que la proteína se mantendría como un monómero, tal como se muestra en la figura 31(a). Por otra parte, en la figura 31(b) se observa que a medida que la lipasa de Cal-B es modificada, su movilidad electroforética se incrementa, en contraste a lo observado cuando la enzima fue modificada por reacciones de aminación. Este efecto es el resultado del aumento en la carga neta negativa en la superficie de la lipasa causado por la modificación química.

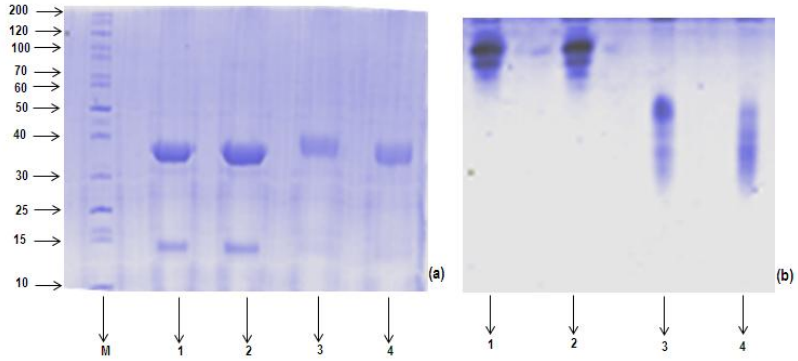


Figura 31. (a) *Electroforesis SDS-PAGE y PAGE-Nativa* ***(b)*** *de los derivados modificados de Cal-B. Carril M: Marcador de peso molecular, Carril 1: CalB-Octil no modificada, Carril 2: CalB-S-10%, Carril 3: CalB-S-50%, Carril 4: CalB-S-100%*

- ***Efecto de la modificación química por reacciones de succinilación, sobre la actividad hidrolítica frente al p-NPB de la Cal-B inmovilizada en soportes de octil agarosa***

La actividad hidrolítica frente al p-NPB de los diferentes derivados enzimáticos de Cal-B inmovilizada sobre soportes de octil agarosa sin modificar (Cal-B-Octil) y de los derivados modificados por reacciones de succinilación (Cal-B-S-10%, Cal-B-S-50%, Cal-B-S-100%) se registra en la Tabla 8. En ella se observa que la modificación química por reacciones de succinilación ejerce un efecto desfavorable sobre la actividad de la enzima. De esta manera, en la medida que Cal-B es modificada, su actividad catalítica es notoriamente reducida.

Tabla 8. *Actividad enzimática de los derivados de Cal-B modificados por reacciones de succinilación. Condiciones de ensayo: La actividad enzimática fue determinada usando como sustrato p-NPB 0,4mM en buffer fosfato pH 7, 25mM a 25ºC*

Derivados succinilados	**Octil-Cal-B**	**CalB-S-10%**	**CalB-S-50%**	**CalB-S-100%**
Actividad (U/g)	17.2	16.3	6.4	6.0

Teniendo en cuenta que Cal-B presenta residuos aminoacídicos de lisina cercanos al lid o tapadera, es probable que al ejercer la modificación parcial y completa de la superficie de la proteína por reacciones de succinilación, estos residuos sean alterados y la enzima adopte una orientación diferente, que conlleve a una conformación desfavorable para la actividad catalítica de la enzima (Cabrera *et al*; 2009; Barbosa *et al;* 2010).

- ***Estudio del efecto de la modificación química por reacciones de succinilación sobre la estabilidad térmica y frente a solventes orgánicos de la Cal-B inmovilizada en soportes de octil agarosa***

- **Efecto de la modificación química por reacciones de succinilación sobre la estabilidad térmica de los derivados modificados de Cal-B inmovilizados en soportes de octil agarosa**

La estabilidad de los derivados de Cal-B modificados (Cal-B-S-10%, Cal-B-S-50%, Cal-B-S-100%) y sin modificar (Cal-B-Octil) por reacciones de succinilación química fue evaluada a 70 ºC bajo

condiciones de pH neutro. El curso de inactivación se muestra en la figura 32.

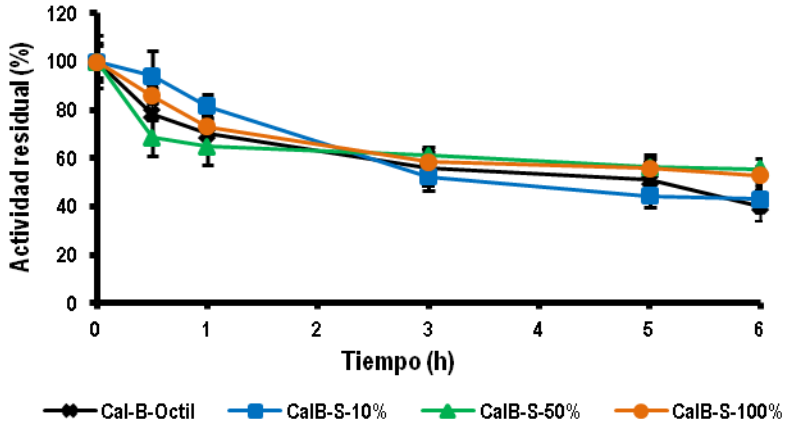


***Figura 32**. Curso de inactivación térmica a 70ºC de los derivados modificados y sin modificar de la Cal-B. La actividad fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4mM) en buffer fosfato pH 7, 25mM a 25 ºC.*

Bajo las condiciones de inactivación térmica (70ºC y pH neutro), todos los derivados de Cal-B modificados por reacciones de succinilación química y no-modificados presentaron una tendencia muy similar. Sin embargo, después de 5 horas del curso de inactivación, los derivados modificados en mayor nivel, es decir al 50 y 100% conservaron más del 55% de su actividad inicial, siendo un 15% más estables que el derivado modificado en un bajo nivel (Cal-B-S-10%) y que el derivado sin modificar, los cuales retenían en promedio un 45% de su actividad inicial.

- **Efecto de la modificación química sobre la estabilidad frente a solventes orgánicos de los derivados modificados de Cal-B inmovilizados en soportes de octil agarosa**

La estabilidad frente a solventes orgánicos de los preparados de Cal-B modificados y sin modificar por reacciones de succinilación fue evaluada en presencia de 50% de THF. El curso de inactivación se muestra en la figura 33. En ella se observa que en presencia de solvente orgánico la preparación de Cal-B sin modificar (CalB-Octil) y modificada de forma parcial al 10% (CalB-S-10%), perdieron cerca del 45% de su actividad catalítica durante la primera hora del curso de inactivación. Las preparaciones de Cal-B modificadas en un mayor grado (CalB-S-50% y CalB-S-100%) conservaron más del 65% de actividad, durante el mismo tiempo.

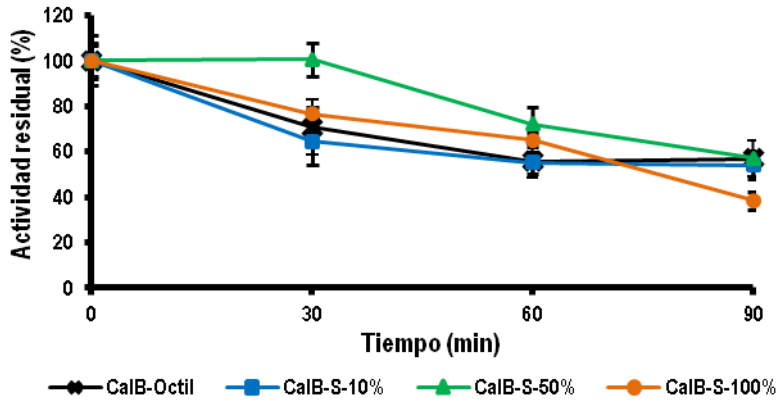


Figura 33. *Curso de inactivación en presencia de solvente orgánico (THF) de los derivados modificados y sin modificar de la Cal-B. La actividad fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4mM) en buffer fosfato pH7, 25mM a 25 ºC.*

De acuerdo con lo anterior, aunque la modificación química por reacciones de succinilación en un alto nivel genera pérdida de actividad en la lipasa de Cal-B, al parecer los nuevos grupos con carga negativa

favorecen interacciones del tipo puentes de hidrógeno o enlaces iónicos que permiten la estabilización de la enzima.

3.3.2. Efecto de la modificación química por reacciones succinilación sobre las propiedades de la TLL inmovilizada en soportes de octil agarosa

A diferencia de la Cal-B, TLL presenta en su estructura primaria 7 residuos de lisina, que pueden ser probablemente modificados por reacciones de succinilación química. Dos de estos residuos están ubicados en la proximidad del lid (naranja) y los 5 restantes se ubican en la cara posterior a la tapadera. La distribución de los residuos aminoacídicos de lisina (verde azulado) y su cercanía con el centro activo y el lid o tapadera se muestra en la figura 34.

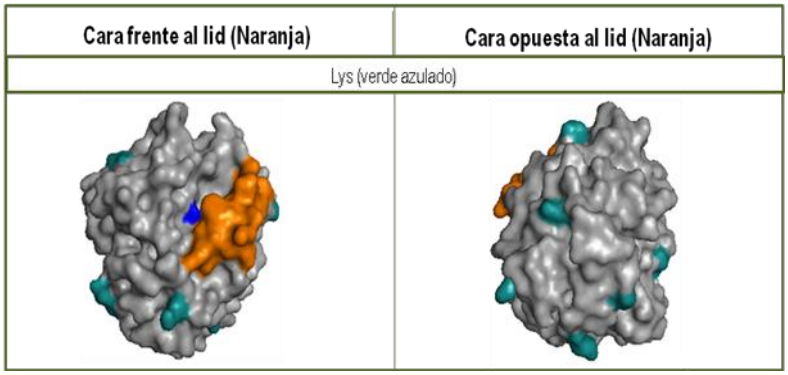


Figura 34. *Estructura tridimensional de la lipasa de Thermomyces lanuginosus (Estructura 3D obtenida de la base de datos PDB. Software visualizador utilizado PYMOL viewer versión 0.99. El código de PDB 1DTE. Código de colores: centro activo (azul), lid o tapadera (naranja), residuos de lisina (verde azulado).*

- ***Caracterización electroforética de los derivados de TLL succinilados inmovilizados en octil agarosa***

Nuevamente, el perfil electroforético de los derivados de TLL succinilados fue obtenido pos SDS-PAGE y PAGE-Nativa, como se muestra en la figura 35(a) y (b). Bajo condiciones nativas es posible observar el incremento en la movilidad de los derivados modificados por reacciones de succinilación de la TLL.

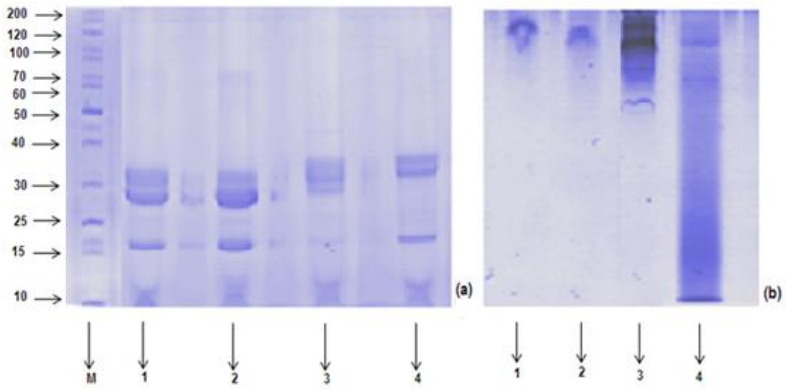


Figura 35. (a) *Electroforesis SDS-PAGE y PAGE-Nativa* ***(b)*** *de los derivados modificados de TLL. Carril M: Marcador de peso molecular, Carril 1: Octil-TLL no modificada, Carril 2: TLL-S-10%, Carril 3: TLL-S-50%, Carril 4: TLL-S-100%*

- ***Efecto de la modificación química por reacciones de succinilación, sobre la actividad hidrolítica frente al p-NPB de la TLL inmovilizada en soportes de octil agarosa***

La actividad hidrolítica frente al p-NPB de los diferentes derivados de TLL inmovilizados sobre soportes de octil agarosa sin modificar (TLL-Octil) y de los derivados modificados por reacciones de succinilación (TLL-S-10%, TLL-S-50%, TLL-S-100%) se registra en la Tabla 9. En ella se observa que la modificación química por reacciones de succinilación ejerce un efecto desfavorable sobre la actividad de la TLL.

De esta manera, en la medida que la enzima es modificada, su actividad catalítica es notoriamente reducida. En este sentido es probable que la modificación química de los residuos de lisina cercanos al lid, conlleven a cambios desfavorables en la conformación de la lipasa.

Tabla 9. *Actividad enzimática de los derivados de TLL modificados por reacciones de succinilación. Condiciones de ensayo: La actividad enzimática fue determinada usando como sustrato p-NPB 0.4mM, buffer fosfato pH 7 25mM a 25ºC*

Derivados succinilados	**Octil-TLL**	**TLL-S-10%**	**TLL-S-50%**	**TLL-S-100%**
Actividad (U/g)	75.9	39.70	26.37	23.73

La modificación parcial de TLL (TLL-S-10%) por reacciones de succinilación provocó una pérdida de actividad del 52% en comparación con la enzima sin modificar. La modificación completa (TLL-S-100%) conllevó a una pérdida superior al 70% de la actividad en comparación con la enzima sin modificar. En este contexto, es posible considerar que al modificar los grupos amino, por grupos carboxilos cargados negativamente, la lipasa puede cambiar su orientación y conformación proteica afectando las propiedades biocatalíticas.

- ***Estudio del efecto de la modificación química por reacciones de succinilación sobre la estabilidad térmica y frente a solventes orgánicos de la TLL inmovilizada en soportes de octil agarosa***

- **Efecto de la modificación química por reacciones de succinilación sobre la estabilidad térmica de los derivados modificados de TLL inmovilizados en soportes de octil agarosa**

La estabilidad de los derivados de TLL modificada (TLL-S-10%, TLL-S-50%, TLL-S-100%) y sin modificar (TLL-Octil) fue evaluada a 70 ºC y pH 7. El curso de inactivación térmica mostrado en la figura 35 muestra que TLL modificado al 10% (TLL-S-10%) fue el derivado más estable durante el curso de inactivación térmica. El derivado modificado al 50% (TLL-S-50%) fue el más inestable, y el derivado modificado al 100% presenta un comportamiento similar a la enzima no modificada.

Teniendo en cuenta que TLL presenta dos residuos de lisina en la proximidad del lid, incluso uno de ellos hace parte de la conformación de este segmento peptídico (Allan, 2000), es posible considerar que al ejercer la modificación química parcial o completa de estos residuos sean alteradas interacciones vitales que favorecen la estabilidad de la estructura de la proteína, lo que contribuye a la desestabilización bajo las condiciones de inactivación a las que es sometida la enzima.

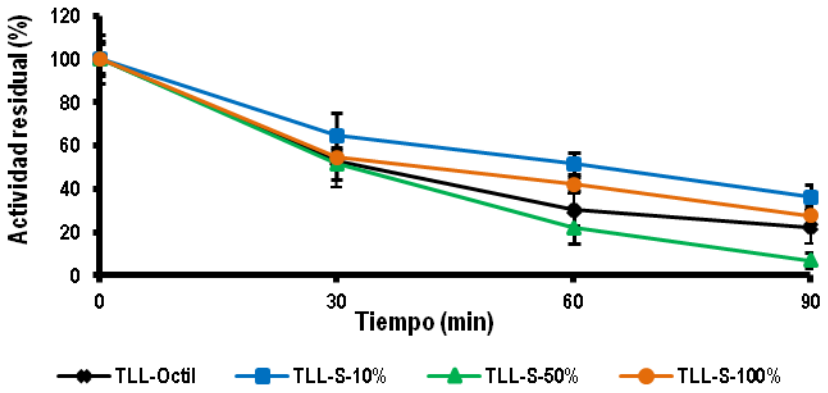


***Figura 36**. Curso de inactivación térmica a 70ºC de los derivados modificados y sin modificar de la TLL. La actividad fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4mM) en buffer fosfato pH7, 25mM a 25 ºC.*

- **Efecto de la modificación química por reacciones de succinilación sobre la estabilidad frente a solventes orgánicos de los derivados modificados de TLL inmovilizados en soportes de octil agarosa**

En la Figura 37 se muestran los resultados de la estabilidad frente a solventes orgánicos de los preparados de TLL modificados y sin modificar. En ella se muestra que todos los derivados presentaron una tendencia similar, registrando pérdidas de actividad de más del 50% en los primeros 15 minutos del curso de inactivación. En este sentido, la modificación química por reacciones de succinilación causó un efecto nulo en la estabilidad de la lipasa de TLL. De esta manera, los diferentes derivados mostraron la misma tendencia sin importar el grado de modificación.

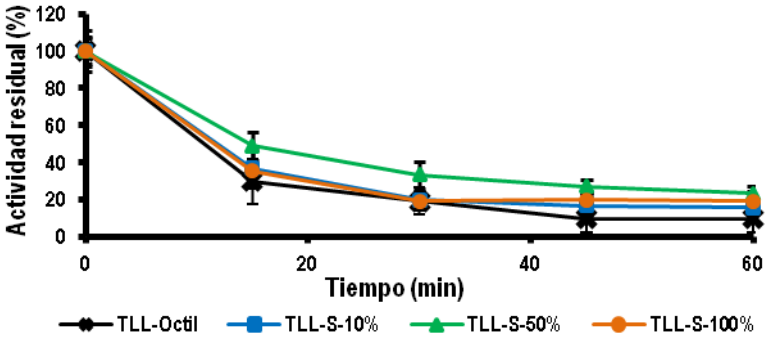


Figura 37. *Curso de inactivación en presencia de solvente orgánico (THF) de los derivados modificados y sin modificar de la TLL. La actividad fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4mM) en buffer fosfato pH7, 25mM a 25 ºC.*

3.3.3 Efecto de la modificación química por reacciones de succinilación sobre la estabilidad de diferentes lipasas microbianas

En la Tabla 10 se muestran los valores del tiempo de vida media para cada uno de los derivados de Cal-B y TLL inmovilizados en soportes de octil agarosa, modificados y sin modificar por reacciones de succinilación química con anhídrido succínico.

Tabla 10. *Efecto de la succinilación sobre el tiempo de vida media de los diferentes derivados de Cal-B y TLL inmovilizados en soportes de octil agarosa, bajo diferentes condiciones de inactivación*

Tiempo de vida media (h)					
Condiciones de inactivación			**Condiciones de inactivación**		
Derivados Cal-B	**70ºC pH 7**	**50% THF pH 7**	**Derivados TLL**	**70ºC pH 7**	**50% THF pH 7**
Cal-B-Octil	5	1.5	**TLL-Octil**	0.5	0.2
CalB-S-10%	4	1.5	**TLL-S-10%**	1	0.2
CalB-S-50%	6	1.6	**TLL-S-50%**	0.5	0.3
CalB-S-100%	6	1.3	**TLL-S-100%**	0.5	0.2

En el proceso de inactivación térmica a 70ºC, la lipasa de Cal-B con modificación parcial (50%) y completa (100%) provocó la estabilización de la enzima en un factor de 1.2 veces en comparación con la enzima sin modificar. Bajo las mismas condiciones, la modificación parcial al 10% mejoró la estabilidad de la lipasa de TLL en un factor de 2 veces. En el caso de la inactivación por presencia de solvente orgánico, la modificación química de la enzima por reacciones de succinilación,

provocó un efecto nulo o poco significativo sobre la estabilidad de las lipasas de Cal-B y TLL.

Los diferentes tipos de modificación química (aminación y succinilación) permitieron cambios en las propiedades de actividad, estabilidad y movilidad electroforética de las lipasas de *Candida antarctica B y Thermomyces lanuginosus.* Estos tipos de modificación química han sido ampliamente utilizados como estrategias que facilitan la inmovilización de las lipasas sobre diferentes tipos de soportes con características químicas determinadas (Fernandez *et al;* 1994; Fernández-Lorente *et al;* 2011).

Durante esta investigación se utilizó la modificación química por reacciones de aminación como una estrategia novedosa para la preparación de nuevos biocatalizadores. Cal-B y TLL cuya superficie fue modificada por reacciones de aminación al 100%, fueron utilizadas para la preparación de agregados enzimáticos entrecruzados CLEAs, los cuales fueron finalmente utilizados como biocatalizadores en la resolución cinética del R/S-Propanolol.

3.4 Evaluación del efecto de la modificación química por reacciones de aminación en la síntesis de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) de la Cal-B y la TLL

La síntesis de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) ocurre por la reacción entre los grupos amino de la superficie de la proteína y un agente bifuncional como el glutaraldehído. Cuando las proteínas son muy pobres en residuos aminoacídicos de lisina externos, la preparación de CLEAs es complicada, debido a que el paso de entrecruzamiento involucra principalmente este tipo de residuos (Wilson *et al;* 2006; López-Serrano *et al;* 2002; Cruz *et al;* 2012).

La modificación química por reacciones de aminación provee a la enzima de nuevos grupos amino que facilitarían el entrecruzamiento de la lipasa, dando lugar a un nuevo biocatalizador insoluble. De acuerdo con lo anterior, durante esta investigación se hizo uso de las ventajas de la aminación química para preparar CLEAs de las lipasas de *Candida antarctica B y Thermomyces lanuginosus* que habían sido previamente modificadas al 100% por reacciones de aminación en fase sólida.

En la figura 38 se observa el proceso para la obtención final del agregado enzimático entrecruzado CLEA.

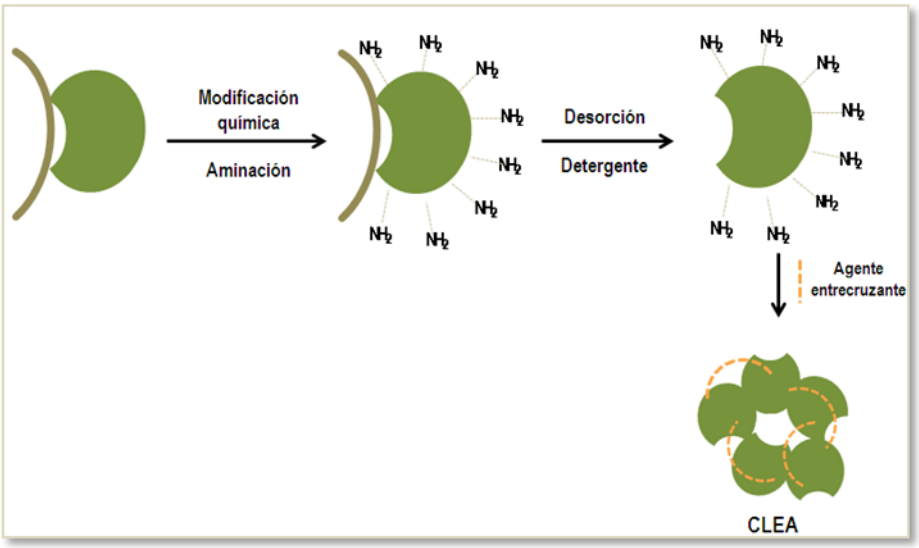


***Figura 38**. Esquema general de la obtención de la lipasa modificada por reacciones de aminación para la formación de agregados enzimáticos entrecruzados CLEAs.*

Según se describe en la figura 38, durante la primera fase, la lipasa que ha sido adsorbida en soportes de octil agarosa, es completamente modificada por reacciones de aminación como se describe en la

sección 2.2.2. Posteriormente la lipasa es desorbida desde el soporte hidrofóbico por la acción de un detergente según se describe en la sección 2.2.1. Una vez la enzima ha sido desorbida y se encuentra en fase soluble y pura, se procede a la preparación de los CLEAs, precipitando la enzima y entrecruzándola mediante el uso de un agente bifuncional como el glutaraldehído.

3.4.1 Síntesis de CLEAs de la lipasa de *Candida antarctica B* modificada por reacciones de aminación

- ***Selección del agente precipitante para la Cal-B***

Inicialmente, se seleccionó el mejor agente precipitante para la Cal-B. Para ello fueron evaluados tres diferentes agentes precipitantes: sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$, t-Butanol y 1-Propanol. En la Tabla 11 se consigna el efecto del agente precipitante en la actividad enzimática obtenida en la suspensión y en el sobrenadante luego de la precipitación de la enzima a partir de una preparación soluble de Cal-B.

Tabla 11. *Efecto del tipo de agente precipitante sobre la actividad enzimática de la Cal-B precipitada. La actividad fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4mM) en buffer fosfato pH 7, 25mM a 25 ºC.*

U-iniciales	**37,28**		
Agente precipitante	**Concentración (%v/v)**	**U Suspensión**	**U Sobrenadante**
$(NH_4)_2SO_4$	**50%**	33.2	9.48
	70%	31.57	1.90
	90%	34.5	2.88
t-Butanol	**50%**	37.94	35.10
	70%	31.35	6.26
	90%	**39.62**	**0.62**
1-Propanol	**50%**	21.93	19
	70%	18.97	14.94
	90%	16.96	0.78

De acuerdo con la tabla 11, el solvente orgánico t-butanol fue seleccionado como el mejor agente precipitante para la Cal-B. El uso de t-Butanol al 90% conlleva a una precipitación de aproximadamente el 98% de la enzima libre sin pérdidas de actividad, a diferencia de los demás agentes precipitantes utilizados. Por ejemplo, cuando se usó 1-Propanol como agente precipitante se observó una pérdida de actividad superior al 40 %, que es atribuida a la desnaturalización de la enzima, inducida por la presencia del solvente orgánico en el microentorno de la proteína (Wang *et al;* 2011).

- ***Síntesis y caracterización del CLEA de Cal-B***

Una vez seleccionado el t-Butanol como el mejor agente precipitante para la Cal-B, se preparó el nuevo agregado enzimático entrecruzado, el cual fue denominado CLEA-CalB. Este presentó una actividad hidrolítica frente al p-NPB de **111 U/g-$_{CLEA}$**. EL CLEA-CalB fue caracterizado por electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes y su estabilidad térmica fue evaluada a 70ºC.

En la figura 39 se observa el perfil electroforético de la lipasa de Cal-B en su forma soluble (Carril 1). En el carril 2 Cal-B inmovilizada en soportes de octil agarosa y en el carril 3 el nuevo agregado enzimático entrecruzado CLEA-CalB. Este último es retenido en la parte superior del gel, debido a la formación de un agregado proteico de estructura rígida y de alto peso molecular.

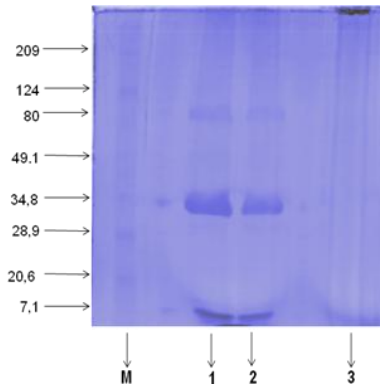


Figura 39. *Electroforesis SDS-PAGE. Carril M: Marcador de peso molecular; Carril 1: enzima soluble; Carril 2: Cal-B-Octil; Carril 3: CLEA-CalB*

- ***Evaluación de la estabilidad térmica del CLEA de Cal-B***

En la figura 40 se observa el perfil de inactivación térmica a 70ºC de la Cal-B inmovilizada en soportes de octil agarosa y del nuevo biocatalizador CLEA-CalB. El CLEA-CalB es notablemente más estable que la enzima adsorbida en soportes hidrofóbicos de octil agarosa. El nuevo derivado de Cal-B conserva más del 80% de actividad hidrolítica frente al p-NPB durante la primera hora del curso de inactivación, en comparación con la enzima inmovilizada en el soporte de octil agarosa que ha perdido el 50% de actividad hidrolítica en el mismo tiempo.

Estas diferencias son atribuidas a que la lipasa en los soportes de octil agarosa, se encuentra únicamente adsorbida mediante interacciones hidrofóbicas o de tipo iónico, que ante condiciones extremas de temperatura tienden a romperse causando la desnaturalización de la enzima. En el caso de los agregados enzimáticos entrecruzados, en los que intervienen enlaces de tipo covalente, la estructura terciaria de la enzima adquiere una mayor rigidez y es más estable a la inactivación térmica (Arroyo, 1998).

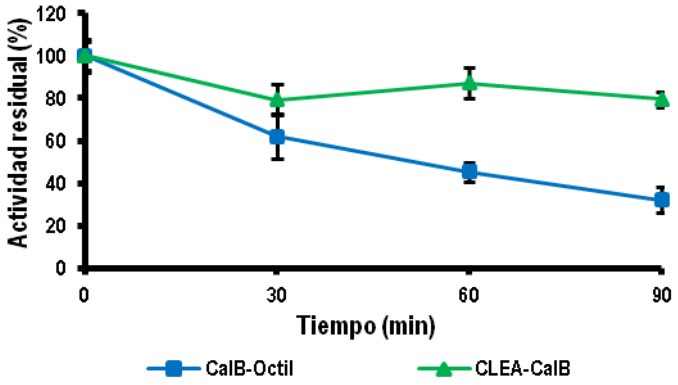


***Figura 40**. Curso de inactivación térmica a 70ºC de los derivados de Cal-B en octil agarosa y del CLEA-CalB. La actividad fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4mM) en buffer fosfato pH7, 25mM a 25 ºC.*

3.4.2 Síntesis de CLEAs de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* modificada por reacciones de aminación

- ***Selección del agente precipitante para la TLL***

Con el objetivo de encontrar el mejor agente precipitante para la TLL, fueron evaluados tres diferentes agentes precipitantes: sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$, etanol y 2-Propanol. En la Tabla 12 se consigna el efecto del agente precipitante sobre la actividad enzimática obtenida en la suspensión y en el sobrenadante justo después que la enzima ha sido precipitada a partir de una preparación soluble de TLL.

De acuerdo con la tabla 12, todos los agentes precipitantes evaluados, causaron un efecto desfavorable sobre la actividad de la lipasa de TLL. Este efecto puede ser atribuido a que usualmente los solventes miscibles en agua inducen la desnaturalización de la proteína, lo que conlleva a la pérdida de actividad en la enzima. Esta desnaturalización enzimática puede ser provocada por una alteración en la conformación

de la lipasa o por la eliminación de moléculas de agua indispensables para la actividad catalítica la misma (Gorman y Dordick, 1992; Kim *et al;* 2000; Wang *et al;* 2011).

En este contexto, el agente precipitante seleccionado para la TLL fue el etanol. Se seleccionó el etanol, ya que su efecto fue aproximadamente 2 veces menor en comparación con los demás solventes utilizados y conllevó a la precipitación de aproximadamente el 80% de la enzima libre.

Tabla 12. *Efecto del tipo de agente precipitante sobre la actividad enzimática de la TLL precipitada. La actividad fue determinada usando como sustrato p-NPB (0,4mM) en buffer fosfato pH7, 25mM a 25 ºC.*

U-iniciales	**840**		
Agente precipitante	**Concentración (%v/v)**	**U Suspensión**	**U Sobrenadante**
$(NH_4)_2SO_4$	**50%**	233.7	123.3
	70%	188.3	111.4
	90%	203.3	44.8
Etanol	**50%**	226.1	118.4
	70%	200.6	53.3
	90%	**280.2**	**55.8**
2-Propanol	**50%**	186.2	87.8
	70%	272.5	126.2
	90%	255.4	128.7

- ***Síntesis y caracterización del CLEA de TLL***

Una vez seleccionado el etanol como el mejor agente precipitante para la TLL, se preparó el nuevo agregado enzimático entrecruzado el cual fue denominado CLEA-TLL. Este presentó una actividad hidrolítica frente al p-NPB de **96 U/g-$_{CLEA}$**. EL CLEA-TLL fue caracterizado por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE y su estabilidad térmica fue evaluada a 70ºC.

En la figura 41 se observa el perfil electroforético de la lipasa de TLL en su forma soluble (Carril 1), TLL inmovilizada en soportes de octil agarosa (carril 2) y el nuevo agregado enzimático entrecruzado CLEA-TLL (carril 3). El agregado enzimático entrecruzado es retenido en la parte superior del gel de electroforesis debido a que posee una estructura de alto peso molecular construida por enlaces covalentes.

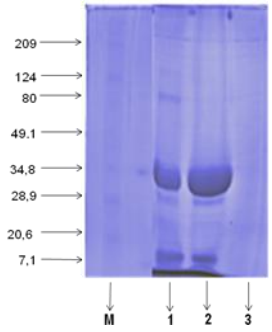


Figura 41. *Electroforesis SDS-PAGE. Carril M: Marcador de peso molecular; Carril 1: enzima soluble; Carril 2: TLL-Octil; Carril 3: CLEA-TLL*

- ***Evaluación de la estabilidad térmica del CLEA de TLL***

Finalmente, en la figura 42 se observa el perfil de inactivación térmica del agregado enzimático entrecruzado de TLL y de la TLL adsorbida en soportes hidrofóbicos de octil agarosa. El CLEA-TLL conserva el 100%

de actividad hidrolítica frente al p-NPB durante el curso de inactivación, siendo más estable que la enzima adsorbida en el soporte de octil agarosa, la cual ha perdido el 30% de actividad durante la primera hora del curso de inactivación.

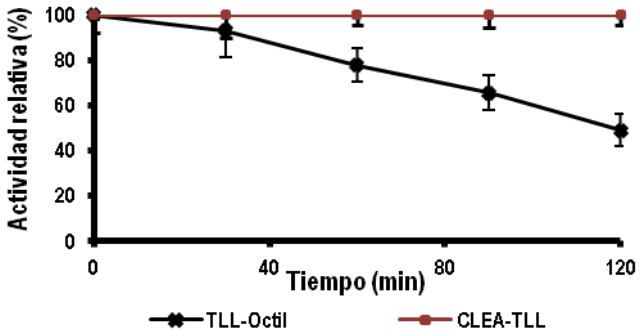


Figura 42. *Curso de inactivación térmica a 70ºC de los derivados de TLL en octil agarosa y del CLEA-TLL. La actividad fue determinada usando como sustrato p-NPB (0.4mM) en buffer fosfato pH7, 25mM a 25 ºC.*

En general, los nuevos agregados enzimáticos entrecruzados preparados a partir de la Cal-B y la TLL modificadas por reacciones de aminación, conservaron más del 90% de la actividad hidrolítica durante el curso de inactivación térmica a 70ºC. Por otra parte, las figuras 39 y 41, correspondientes a la electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes para los derivados enzimáticos de Cal-B y TLL respectivamente, mostraron que la modificación química por reacciones de aminación permitió un correcto entrecruzamiento, pues al incubar los nuevos CLEAs a 100ºC y en presencia de SDS no hubo liberación de proteína al sobrenadante, lo que sugiere que el entrecruzamiento de la proteína agregada fue alcanzado (Wilson *et al;* 2006).

Este mismo efecto, fue observado por Wilson y colaboradores quienes en el 2006 prepararon agregados enzimáticos entrecruzados de la lipasa de *Alcaligenes sp (QL)* utilizando agentes co-precipitantes como la polietilenimina (PEI) con el fin de rodear la enzima con nuevos grupos amino y facilitar su adecuado entrecruzamiento. Otros autores, han encontrado resultados similares al utilizar proteínas alimentadoras con abundantes grupos amino como la albumina de suero bovino (Shah *et al;* 2006; Cruz *et al;* 2012).

En este contexto, la modificación química por reacciones de aminación con etilendiamina, resulta una herramienta útil y novedosa en la preparación de agregados enzimáticos entrecruzados CLEAs.

3.5 Evaluación de la enantioselectividad de los agregados enzimáticos entrecruzados de Cal-B y TLL en la resolución cinética del R/S-Propanolol.

La enantioselectividad de los agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) de Cal-B y TLL fue evaluada en la resolución cinética del R/S-Propanol. La reacción de transesterificación se llevo a cabo en tolueno bajo las condiciones descritas en la sección 2.2.5. En la tabla 13 se registra los resultados más relevantes obtenidos con los CLEAs de Cal-B y TLL en la reacción de transesterificación del propanolol racémico.

Tabla 13. *Exceso enantiomérico (ee), enantioselectividad (E) de los agregados enzimáticos entrecruzados de Cal-B y TLL, evaluada en la resolución cinética del R/S-Propanolol.*

CLEA	Enantiopreferencia	Actividad (U/g)	Conversión (%)	t (h)	ee	E
CLEA-CalB	**R**	**28.3**	**17**	**2**	**37**	**5**
CLEA-TLL	**R**	**16.8**	**19**	**2**	**55**	**4.3**

Los CLEAs de Cal-B y TLL presentaron enantiopreferencia hacia el enantiómero R. Para el caso de la Cal-B, con anterioridad este efecto se ha explicado de acuerdo con el modo de enlace del sustrato al sitio activo de la enzima. El reactante rápido, en este caso el R-enantiómero orienta su cadena acil hidrofóbica en el tunel de la lipasa que conduce al sitio activo (Grochulsky *et al;* 1993; Barbosa *et al;* 2010). Por su parte, TLL ha sido utilizada en la reacción de acetilación de 3-Feniltio-2-propanol utilizando acetato de vinilo y se ha observado que ésta acetila selectivamente al enantiómero R, mientras que con el enantiómero S, no reacciona (Fernandez, R; 2010).

Los CLEA-CalB y CLEA-TLL mostraron una alta actividad en la reacción de transesterificación del propanolol racémico. Sin embargo, la enantioselectividad de los dos biocatalizadores fue muy baja en comparación al valor aceptado (20), E=5 para el CLEA-Cal-B y E=4.3 para el CLEA-TLL. Valores de enantioselectividad similares fueron reportados en el 2006 por Wilson y colabordores para los CLEAs de Cal-B preparados en presencia de agentes co-precipitantes como la polietilenimina (PEI), al ser utilizados en la hidrólisis enántioselectiva del Glicidil butirato (E=3.8).

Este efecto podría explicarse en términos de la rigidez conformacional, adoptada por las moléculas de enzima en el agregado enzimático entrecruzado final, cuya formación podría inducir una conformación desfavorable para las moléculas de la lipasa lo que llevó a una baja enantioselectividad en la resolución del R/S-Propanolol (Barbosa *et al;* 2010).

4. CONCLUSIONES

- Se modularon las propiedades de actividad y estabilidad de las lipasas microbianas de *Candida antarctica B (Cal-B) y Thermomyces lanuginosus (TLL),* mediante la modificación química por reacciones de aminación y succinilación.

- La modificación parcial por reacciones de aminación de la Cal-B causó un efecto irrelevante sobre la actividad de la lipasa. Adicionalmente, provocó la desestabilización de la proteína cuando esta fue sometida a condiciones de inactivación térmica.

- Se logró mejorar la actividad y estabilidad de la TLL al ser modificada por reacciones de aminación. La enzima completamente modificada fue estabilizada en un factor de 6 veces en comparación a la enzima no modificada.

- La modificación parcial y total por reacciones de succinilación de los residuos de lisina presentes en la superficie de la Cal-B y la TLL, provocó una notable reducción en la actividad enzimática de las lipasas. Sin embargo, este tipo de modificación causó un efecto irrelevante en la estabilidad de las lipasas en estudio.

- El solvente orgánico t-butanol fue seleccionado como el mejor agente precipitante para la Cal-B. El t-Butanol al 90% (v/v) conlleva a una precipitación de aproximadamente el 98% de la enzima libre sin pérdidas de actividad. Para la TLL el mejor

agente precipitante fue el etanol al 90% (v/v), el cual permitió la precipitación de aproximadamente el 80% de la enzima libre.

- La modificación química por reacciones de aminación fue una herramienta novedosa en la preparación de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs). La modificación de la superficie de la Cal-B y la TLL por reacciones de aminación, conllevó a un correcto entrecruzamiento entre el glutaraldehído y la enzima modificada.

- Los agregados enzimáticos entrecruzados de Cal-B y TLL presentaron una estabilidad térmica, superior a la lipasa inmovilizada en octil agarosa. CLEA-CalB y CLEA-TLL conservaron el 90% y 100% de actividad catalítica durante el curso de inactivación térmica a 70ºC, respectivamente. Mientras que los derivados de Cal-B y TLL en octil agarosa perdieron el 55 y 30% de actividad catalítica durante la primera hora del curso de inactivación, respectivamente.

- Se determinó que aunque los agregados enzimáticos entrecruzados de Cal-B y TLL, registraron una alta actividad en la reacción de transesterificación del R/S-propanolol, exhibieron una baja enantioselectividad (E) en la resolución cinética de la mezcla racémica de interés, 5 y 4.3 (Valor de E) para el CLEA-CalB y CLEA-TLL, respectivamente.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allan S. Lipase protein engineering. Biochim. Biophys. Acta. 2000, 223-238
- Amotz S. Method for production of an immobilized enzyme preparation by means of crosslinking agent. 1987. US 4,665,028.
- Avila R, Ruiz R. Increased racemate resolution of propranolol esters by lipase immobilized catalysis. Latin Am. Appl. Res. 2005, 35: 307-311.
- Arroyo M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. Ars Pharmaceutica. 1998; 39 (2):23-39.
- Arroyo M. Síntesis de ácidos 2-aril-propiónicos homoquirales mediante esterificación enantioselectiva catalizada por lipasas inmovilizadas. [Tesis doctoral]. [Madrid, España]: Universidad complutense de Madrid. 1995.
- Alcalde M. Modificación química y estabilización de glicosiltransferasas: ciclodextrin glicosiltransferasa y dextransacarasa. [Tesis doctoral]. [Madrid, España]: Universidad complutense de Madrid. 1999.
- Barbosa O, Ariza C, Ortiz C, Torres R. Kinetic resolution of (R/S)-propranolol (1 isopropylamino-3-(1-naphtoxy)-2-propanolol) catalyzed by immobilized preparations of *Candida antarctica lipase B* (CAL-B). New Biotechnol. 2010, 27: 844-850.
- Bastida A, Sabuquillo P. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. Biotechnol. Bioeng. 1998, 58: 486-493.

- Bellezza F, Cipiciani A, Cinelli S, Onori G. Influence of alcohol and osmolytes on thermal stability and catalytic activity of myoglobin: Co-solvent clustering effects. Chem. Phys. Lett. 2009, 482: 139-142.
- Brady C, Metcalfe L. Slaboszewski D. Frank D. Lipase immobilized on a hydrophobic microporous support for the hydrolysis of fats. J. Am. Oil. Chem. Soc. 1988, 65: 917-921.
- Branden C, Tooze J. Introduction of protein structure. Garland, New York. Second Edition.
- Brzozowski A, Derewenda, Z. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. Nature. 1991, 351: 491-494.
- Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 1976, 72: 248-254
- Cabrera Z, Fernandez G. Enhancement of Novozym-435 catalytic properties by physical or chemical modification. Process Biochem. 2009, 44: 226–231.
- Carrea G, Riva S. Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents. Angew. Chem. Int. Ed. 2000, 39: 2226-2254.
- Carraway K, Koshland D. Carbodiimide modification of protein. Methods Enzymmol. 1972, 25:616-623.
- Cao L, Langen L. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free. Curr Opin Biotech. 2003; 14: 387-394.
- Cao L, Van L, Sheldon R. Crosslinked aggregates of penicillin acylase: robust catalysts for the synthesis of β-lactam antibiotics. J. Mol. Catal.B: Enzym. 2001, 11: 665-670.

- Cruz J, Barbosa O. Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking. J Mol. Catal. B: Enzym. 2012; 80: 7-14.
- Chen C, Fujimoto Y, Girdaukas G and Sih C. General Aspects and Optimization of Enantioselective Biocatalysis in Organic Solvents: The Use of Lipases.J. Am. Chem. Soc. 1982, 104: 7294–7299.
- Davis B. Chemical modification of biotalysts. Curr. Opin. Biotechnol. 2003, 14: 379-386.
- Diaz A, Davis B. Chemical modification in the creation of novel biocatalyst. Curr.Opin. Chem.Biol. 2011, 15: 211-219.
- Derewenda, U., Brzozowski, A., Lawson, D. and Derewenda, Z.S. Catalysis at the interface: the anatomy of conformational change in a triglyceride lipase. Biochemistry. 1992, 31: 1532-1541.
- Eber O, Buchinger W. Additional Features of Beta-Blockers. Clinical Endocrinology. 1990, 32: 363-370.
- Fernandez R, Armisén P. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. Chem. Phys. Lipids. 1998, 93: 185-197.
- Fernandez R, Rosell C. Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. Enzyme. Microl. Technol. 1994, 17: 517-523.
- Fernandez R, Rosell C, Rodriguez V. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. Enzym. Microb.Technol. 1993, 15: 546-550.

- Fernandez R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus:* Uses and propects as an industrial biocatalyst. J.Mol.Catal.B: Enzym. 2010, 62: 197-212
- Fernandez G, Betancor L, Carrascosa A, Palomo J, Guisan J. Modulation of selectivity of immobilized lipases by chemical and phisycal modifications: released of Omega 3fatty acid from fish oil. J. Am. Oil. Chem.Soc. 2011, DOI 10.1007/s11746-011-1885-x
- Galvis M, Barbosa O, Torres R, Ortiz C, Fernandez R. Effect of solid phase chemical modification on the features of the lipase from *Thermomyces lanuginosus.* Process. Biochem. 2012, 47: 460-466.
- Ghanem, A; Aboul-Enein, H. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. Tetrahedron: Asymmetry: 2004,15, 78, 3331–3351.
- Gilles M, Hudson A, Borders C. Stability of water soluble carbodiimides in aqueos solution. Anal. Biochem. 1990, 184: 244-248.
- Goodman L, Gillman A. The Pharmacological basis of therapeutics, Fourth edition, MacMillan Company, New York. (1985).
- Gotor Fernandez V, Brieva R. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of fharmaceuticals. J Molecular C. 2006; 40:111-120.
- Gorman L, Dordick J. Organic solvents strip water off enzymes. Biotechnol. Bioeng. 1992, 39:392-397.
- Grochulsky P, Li Y. Insights into Interfacial Activation from an Open Structure of *Candida rugosa* Lipase. J Biol Chem. 1993; 268 (17): 12846 - 12847.

- Hoare D; Koshland D. A Method for the Quantitative Modification and Estimation of Carboxylic Acid Groups in Proteins. J Biol Chem. 1967; 242: 2447-2453.
- Kim J, Clark D, Dordick J. Intrinsic effects of solvents polarity on enzymic activation energies. Biotechnol. Bioeng. 2000, 67: 112-116.
- Kim J, Grate J, Wang P. Nanoestructures for enzyme stabilization. Chem. Eng. Sci. 2006, 61: 1017-1026.
- Khajeh K, Naderi H, Ranjbar B. Chemical modification of lysine residues in *Bacillus* α-amylases: effect on activity and stability. Enzyme Microb. Technol. 2001, 28: 543-549.
- Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 1970, 227: 680-685.
- López Serrano P, Cao L. Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. Biotech Lett. 2002; 24: 1379–1383.
- López F, Montes T, Fuentes M. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. J Biotechnol. 2005; 116:1-10.
- Matute B. Resolución cinética dinámica catalizada por enzimas y metales de transición. *An. Quim.* 2006, 102 (4):46-52.
- Martinelli M, Holmquist M, Hult K. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A y B as compared with *Humicula lanuginose* lipase. Biochim. Biophys. Acta: Lip. Lipd. Metabol. 1995, 1258: 272-276.

- Migneault I, Dartiguanave C. Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, an aplication to enzme crosslinking. BioTechniques. 2004, 37: 790-802.
- Orzáez M, Mora P, Mondragón L, Pérez-Payá E**,** Vicent, M. Solid-phase chemistry: A useful tool to discover modulators of protein interactions. Int. J.Pept. Res. Ther. 2007, 13: 281-293.
- Palomo J, Fernández-Lorente G, Guisán J, Fernández-Lafuente R. Modulation of immobilized lipase enantioselectivity via chemical amination. Adv, Synth. Catal. 2007, 349: 1119–27.
- Palomo J, Segura R. Enzymatic resolution of (±)-glycidyl butyrate in aqueous media. Strong modulation of the properties of the lipase from Rhizopus oryzae via immobilization techniques. Tetrahedron: Asymmetry. 2004, 15: 1157–11
- Palomo J, Fernández-Lorente G. Modulation of the enantioselectivity of Candida antarctica B lipase via conformational engineering: kinetic resolution of (±)-hydroxy-phenylacetic acid derivatives. Tetrahedron: Asymmetry. 2002, 13: 1337–1345.
- Palomo J. Control y modulación de la selectividad de diferentes derivados de lipasas en reacciones de química orgánica en medios macro-acuosos. [Tesis doctoral]. [Madrid,España]. Universidad Autónoma de Madrid. 2003.
- Pámies O, Backvall J. Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution. Trends in Biotechnology. 2004, 22: 130-135.
- Penzol G. Diseño de herramientas bioquímicas para la ingeniería molecular de derivados inmovilizados de renina y β-galactosidasa. [Tesis Doctoral]. [Madrid, España]: Universidad Complutense de Madrid. 1996.

- Pérez I, Moreno V. Acilaciones regioselctivas de oligosacáridos catalizadas por enzimas: caracterización y propiedades de los productos. [Tesis doctoral]. [Granada, España]: Universidad de Granada. 2006.
- Pritesh G, Kakoli D. Cahracterization of crooslinked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginose* using glutaraldehyde. Bioresour. T Modulation of the enantioselectivity of Candida antarctica B lipase via conformational engineering: kinetic resolution of (±)-hydroxy-phenylacetic acid derivatives. Technol. 2009, 100: 4074-4076.
- Reis P, Holmberg K, Watzke H. Lipases at interfaces: A review. Adv. Colloid. Interface Sci. 2009, 147-148: 237-250.
- Reetz M. Lipases as practical biocatalysts. Curr Opin Chem BioI. 2002, 6:145-150.
- Rozzell D. Commercial Scale Biocatalysis: Myths and realities. Biorgan Med Chem. 1999, 7: 2253-2261.
- Rodrigues R, Berenguer A. Coupling Chemical Modfication and inmmobilization to Improve the Catalytic Performance of enzymes. Adv. Synth. Catal. 2011, 353: 2216-2238.
- Rodrigues R, Bolivar J, Volpato G. Improved reactivation of immobilized-stabilized lipase from*Thermomyces lanuginosus* by its coating with highly hydrophilic polymers. J. Biotechnol. 2009, 144: 113-119.
- Rodrigues R, Godoy C, Giandra V. Immobilization–stabilization of the lipase from Thermomyces lanuginosus: Critical role of chemical amination. Process Biochem. 2009, 44: 963–968.
- Rua M, Ballesteros A. Rapid purification of two lipases from *Candida rugosa.* Biotechnol. Tech. 1994, 8:21-26

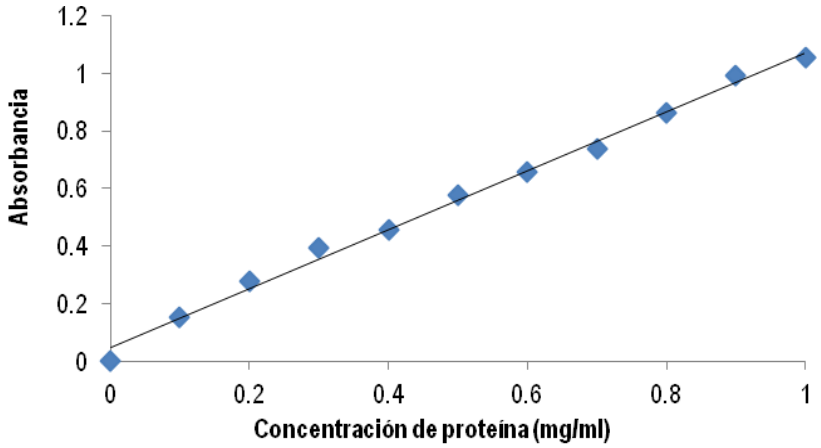
- Sabuquillo P, Reina J, Fernández-Lorente G, Guisán J, and Fernández-Lafuente R. Interfacial affinity chromatography of lipases: separation of different fractions by selective adsorption on supports activated with hydrophobics groups. Biochimica. Biophys. Acta. 1998, 1388: 337-348.
- Shah S, Sharma A. Preparation of crosslinked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. Anal. Biochem. 2006, 351: 207-213.
- Segura R, Betancor L. Purification an identification of different lipases contained in PPL commercial extracts: A minor contaminant is the main responsible of most esterasic activity. Enzyme. Microl.Technol. 2006, 39: 817-823.
- Shoevaart R, Wolbers M, Golubovic. Preparation, Optimization, and structures of Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs). 2004, 87:754-761
- Sharma R, Yusuf C, Utam C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotech Adv. 2001; 19: 627–662
- Sheldon R. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalyst. Biochem. Soc. Trans. 2007.
- Siddiqui K, Cavicchioli. Improved thermal stability and activity in the cold-adapted lipase B from *Candida antarctica* following chemical modification with oxidized polysaccharides. Extremophiles. 2005, 9: 471-476.
- Snyder S, Sobocinski P. An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines. Anal. Biochem. 1975, 64: 284-288.

- Suguira M, Isobe M. Purification of microbial lipases by glass beads coated with hidrofobic materials. Chem. Pharm.Bull. 1977, 23: 1221-1225.
- Uppenberg J, Hansen M, Patkar S, Jones A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal formsof lipase B from Candida antarctica. Structure. 1994, 2: 34-40
- Wang M, Qi W. Enhancement of activity of cross-linked enzyme aggregates by a sugar-assisted precipitation strategy: Technical development and molecular mechanism. J. Biotechnol. 2011, 156: 30-38.
- Wang M, Qi W. Cross-linking enzyme aggregates in the macropores of silica gel: a practical and efficient for enzyme stabilization. Biochem. Eng. J. 2010, 52: 168-174.
- Wehtje J, Adlercreutz P,Mattiasson, B. Thermodynamic and kinetic aspects on water vs. organic solvent as reaction media in the enzyme. Biochim. Biophys. Acta. 1999, 1430: 313–322
- Wilson L, Fernandez G, Fernandez R. CLEAs of lipases an poly-ionic polymers: A simple way of preparing stable biocatalysts with improved propierties. Enzyme Microb. Tech. 2006; 39: 750-755.

ANEXOS

Anexo A

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



$y = 1{,}0242x + 0{,}0484$ $R^2 = 0{,}9947$

Anexo B

La actividad de los diferentes derivados enzimáticos de Cal-B y TLL se determinó de la siguiente manera:

$$Actividad\left(\frac{U}{g.biocatalizador}\right) = m * \frac{10^6}{\varepsilon} * \frac{Vt}{Vm} * \frac{F.D}{C}$$

Donde

m = pendiente (min^{-1})

ε = coeficiente de extinción molar del PNPB (3100 $M^{-1}.cm^{-1}$)

V_t = Volumen total de la reacción

V_m = Volumen de la solución enzimática

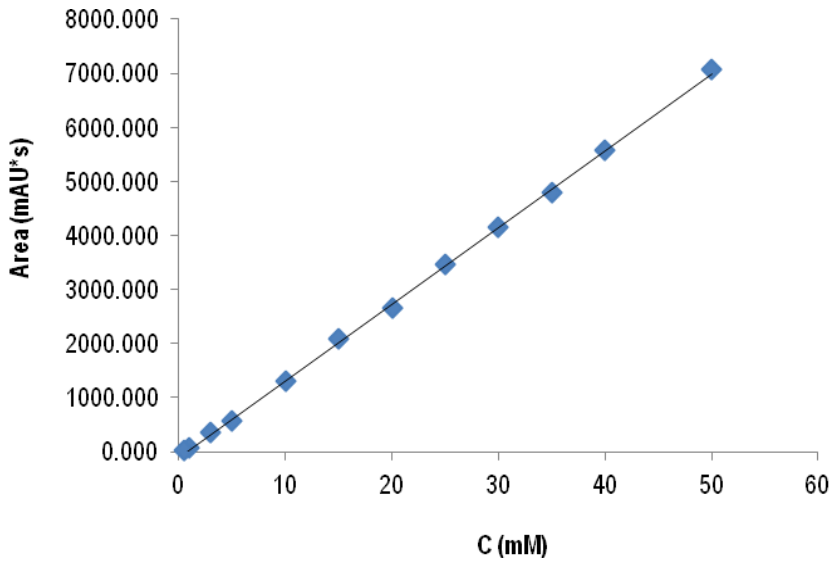
FD = Factor de dilución enzimático

C= concentración del derivado enzimático en g/ml

U = cantidad de enzima necesaria para hidrolizar un mol de PNPB a 25°C

Anexo C

Curva de calibración de la mezcla racémica R/S-Propanolol.



C = (A + 95,83) /141,94

Donde **C** corresponde a la concentración de la mezcla racémica R/S-Propanolol en mM y **A** es el área del pico correspondiente para el sustrato en mAU*s.