

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPASAS MICROBIANAS
INMOVILIZADAS SOBRE NUEVOS SOPORTES OCTIL-AGAROSA
HETEROFUNCIONALES**

NAZZOLY RUEDA ARANGO
Química

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
DOCTORADO EN QUÍMICA
BUCARAMANGA
2016

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPASAS MICROBIANAS
INMOVILIZADAS SOBRE NUEVOS SOPORTES OCTIL-AGAROSA
HETEROFUNCIONALES**

NAZZOLY RUEDA ARANGO

Química

Trabajo de grado para optar al título de Doctora en Química

Directora:

CLAUDIA CRISTINA ORTIZ LÓPEZ

Ph.D Biología Molecular

Codirectores:

ROBERTO FERNÁNDEZ LAFUENTE

Ph.D Ciencias

RODRIGO GONZALO TORRES SÁEZ

Ph.D Bioquímica

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

DOCTORADO EN QUÍMICA

BUCARAMANGA

2016

DEDICATORIA

A DIOS

A MIS PADRES Y HERMANOS

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos por su amor y apoyo incondicional en cada etapa de mi vida. Al resto de mi familia y verdaderos amigos, a quienes amo y respeto enormemente.

A los doctores Rodrigo Torres y Claudia Ortiz por abrirme las puertas del grupo de investigación cuando más lo necesité, por la dirección, las enseñanzas y la confianza brindada.

Al doctor Roberto Fernandez, quien me permitió trabajar en su laboratorio, orientó y brindó su amistad.

Al doctor Oveimar Barbosa, quien fue una parte fundamental en el desarrollo de esta tesis doctoral.

A los directores del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (ICP) en Madrid, Joaquín Pérez Pariente y Jose Carlos Conesa Cegarra.

A los compañeros del grupo de investigación GIBIM y del laboratorio de biocatálisis en Madrid.

A COLCIENCIAS por otorgarme la beca del programa de apoyo a Doctorados Nacionales 2010.

Agradecimiento especial a Santander Universidades por otorgarme la Beca Iberoamérica Jóvenes Profesores e Investigadores, Colombia 2015.

Agradecimiento especial al gobierno español, MINECO, por el proyecto CTQ2013-41507-R.

A la Universidad Industrial de Santander por la beca de sostenimiento durante el 2 semestre del año 2010.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL	22
1. BIOTECNOLOGÍA ENZIMÁTICA.....	22
1.1 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS	23
1.1.1 Tipos de soporte	23
1.1.2 Métodos de inmovilización	25
1.1.2.1 Unión covalente: método de inmovilización irreversible	25
1.1.2.2 Adsorción: método de inmovilización reversible	27
1.1.3 Inmovilización sobre soportes heterofuncionales.....	27
1.2 LIPASAS	29
1.2.1 Generalidades.....	29
1.2.2 Estructura de las lipasas	33
1.2.3 Mecanismo catalítico de las lipasas.....	36
1.2.4 Lipasas de <i>Candida antarctica</i>	37
1.2.4.1 Lipasa A de <i>Candida antarctica</i> (CALA).....	38
1.2.4.2 Lipasa B de <i>Candida antarctica</i> (CALB).....	39
1.2.5 Lipasa de <i>Candida rugosa</i> (CRL).....	40
1.2.6 Lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> (RML)	41
1.2.7 Lipasa de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL)	42
1.2.8 Modulación de las propiedades catalíticas de las lipasas	44
1.2.8.1 Ingeniería del medio de reacción	44
1.2.8.2 Ingeniería del derivado.....	45

1.2.8.3 Modificación química de proteínas.....	47
1.2.9 Inmovilización de lipasas sobre estructuras hidrofóbicas	50
 2. INMOVILIZACIÓN Y ESTABILIZACIÓN EN PRESENCIA DE CATIONES DE LA CONFORMACIÓN ABIERTA DE LAS LIPASAS OBTENIDA MEDIANTE ADSORCIÓN INTERFACIAL SOBRE SOPORTES HIDROFÓBICOS	53
2.1 INTRODUCCIÓN	53
2.2 MATERIALES	54
2.3 MÉTODOS EXPERIMENTALES	54
2.3.1 Inmovilización de lipasas sobre diferentes soportes	56
2.3.1.1 Inmovilización sobre el soporte CNBr	56
2.3.1.2 Inmovilización sobre el soporte Octil-agarosa (OC)	57
2.3.2 Inhibición irreversible de los derivados enzimáticos	57
2.3.3 Inactivación térmica de los diferentes biocatalizadores en presencia de diferentes sales.....	57
2.3.4 Hidrólisis de mandelato de metilo	58
2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	59
2.4.1 Determinación estándar de la actividad enzimática frente al p-NPB.....	59
2.4.2 Determinación del grado de hidrólisis del mandelato de metilo mediante HPLC	59
2.5 RESULTADOS.....	60
2.5.1 Efecto de las condiciones experimentales sobre la inmovilización de lipasas utilizando CNBr y OC agarosa como soportes.....	60
2.5.2 Inhibición irreversible de las lipasas inmovilizadas sobre los soportes OC y CNBr agarosa	63

2.5.3 Estudio del efecto de las condiciones experimentales sobre la actividad hidrolítica del mandelato de metilo.....	66
2.5.4 Efecto de las sales de cloro sobre la estabilidad de los diferentes derivados	69
2.5.5 Efecto de la concentración de $MnCl_2$ o $CaCl_2$ sobre la estabilidad de los diferentes derivados.....	79
2.5.6 Estudio del efecto de Mn^{2+} o Ca^{2+} en la especificidad de los diferentes derivados de RML y CRL	80
2.6 CONCLUSIONES	82
 3. MEJORAMIENTO DE LA ESTABILIDAD Y ESTRATEGIAS DE REACTIVACIÓN DE LIPASAS INMOVILIZADAS SOBRE EL NUEVO SOPORTE HETEROFUNCIONAL OCTIL-GLIOXIL AGAROSA	83
3.1 INTRODUCCIÓN	83
3.2 MATERIALES	84
3.3 MÉTODOS EXPERIMENTALES	85
3.3.1 Preparación de soportes glioxil	87
3.3.2 Inmovilización de enzimas	89
3.3.2.1 Inmovilización de enzimas sobre los soportes octil (OC) y octil-glioxil (OCGLX) agarosa.....	89
3.3.2.2 Inmovilización de enzimas sobre el soporte glioxil (GLX) agarosa	89
3.3.2.3 Reducción con borohidruro de sodio ($NaBH_4$)	90
3.3.2.4 Inmovilización de enzimas sobre el soporte CNBr	90
3.3.3 Desorción de las enzimas de los soportes.....	91
3.3.5 Estudio de la estabilidad de los diferentes biocatalizadores lipásicos	91
3.3.5.1 Inactivación térmica de los diferentes biocatalizadores	91

3.3.5.2 Inactivación de los diferentes biocatalizadores en presencia de co-solventes orgánicos	92
3.3.6 Determinación de la actividad hidrolítica de los biocatalizadores frente a diferentes sustratos.....	92
3.3.6.1 Hidrólisis de hexanoato de etilo	92
3.3.6.2 Hidrólisis de R/S, R o S mandelato de metilo	92
3.3.4 Reactivación mediante desplegamiento y replegamiento de proteínas	93
3.3.4.1 Incubación en cloruro de guanidinio	93
3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	94
3.4.1 Determinación estándar de la actividad enzimática frente al p-NPB.....	94
3.4.2 Determinación del grado de hidrólisis de diferentes sustratos mediante HPLC	94
3.4.2.1 Hidrólisis de hexanoato de etilo	94
3.4.2.2 Hidrólisis de mandelato de metilo	95
3.4.3 Análisis mediante SDS-PAGE	95
3.5 RESULTADOS.....	96
3.5.1 Preparación del soporte OCGLX agarosa.....	96
3.5.2 Inmovilización de lipasas sobre los soportes octil (OC), glioxil (GLX) y octil-glioxil (OCGLX) agarosa.	97
3.5.3 Análisis mediante SDS-PAGE	104
3.5.4 Estabilidad Térmica de los diferentes biocatalizadores	107
3.5.5 Estabilidad de los derivados en solventes orgánicos.....	108
3.5.6 Desorción de las enzimas de los soportes OC durante su inactivación térmica y en solventes orgánicos.....	110
3.5.7 Actividad de los diferentes biocatalizadores frente a diversos sustratos	114

3.5.8 Desplegamiento y replegamiento de los derivados de TLL y CALB	117
3.5.9 Reactivación de CALB y TLL inmovilizadas.....	120
3.5.10 Evaluación de las diferentes enzimas inmovilizadas en la hidrólisis de <i>R</i> y <i>S</i> mandelato de metilo.....	124
3.6 CONCLUSIONES	127
 4. AMINACIÓN QUÍMICA E INCUBACIÓN EN PRESENCIA DE SALES DE LIPASAS INMOVILIZADAS SOBRE EL SOPORTE OCGLX AGAROSA.....	129
4.1 INTRODUCCIÓN	129
4.2 MATERIALES	131
4.3 MÉTODOS EXPERIMENTALES	132
4.3.1 Preparación de soportes glioxil (GLX y OCGLX)	133
4.3.2 Inmovilización de enzimas sobre los soportes octil (OC), octil-glioxil (OCGLX) o glioxil (GLX)	133
4.3.2.1 Inmovilización de enzimas sobre los soportes octil (OC) y octil-glioxil (OCGLX) agarosa.....	133
4.3.2.2 Inmovilización de enzimas sobre el soporte glioxil (GLX) agarosa	134
4.3.2.3 Reducción con borohidruro de sodio	134
4.3.3 Desorción de las enzimas de los soportes.....	135
4.3.4 Modificación química de las lipasas inmovilizadas sobre el soporte octil-agarosa.....	135
4.3.5 Aminación química e inmovilización covalente de las lipasas inmovilizadas sobre OCGLX	136
4.3.6 Inactivación térmica de las diferentes preparaciones enzimáticas.....	137
4.3.7 Inactivación de los diferentes biocatalizadores en presencia de solventes orgánicos	137

4.3.8 Determinación de la solubilidad de CaCl_2 o MnCl_2 a pH 10 en diferentes buffers.....	137
4.3.9 Determinación de la actividad hidrolítica de los biocatalizadores frente a hexanoato de etilo.....	138
4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	138
4.4.1 Determinación estándar de la actividad enzimática frente al p-NPB.....	138
4.4.2 Determinación de la actividad hidrolítica de los biocatalizadores frente a hexanoato de etilo.....	139
4.4.3 Análisis mediante SDS-PAGE	139
4.4.4 Estudio bioinformático de accesibilidad de los solventes a los aminoácidos de CALB susceptibles a modificación química.....	140
4.5 RESULTADOS.....	140
4.5.1 Inmovilización de las lipasas sobre los soportes GLX	140
4.5.2 Preparación de los biocatalizadores de OC y OCGLX	145
4.5.3 Disposición de los grupos reactivos de las diferentes enzimas	152
4.5.4 Estabilidad de las diferentes preparaciones enzimáticas.....	157
4.5.5 Actividad hidrolítica de las diferentes preparaciones enzimáticas en presencia de diferentes concentraciones de acetonitrilo	161
4.5.6 Simplificación del proceso de inmovilización	164
4.5.7 Solubilidad de CaCl_2 y MnCl_2 en diferentes buffers a pH 10	165
4.5.8 Efecto de CaCl_2 en la estabilidad de OCRML y OCCRL a pH 10	165
4.5.9 Preparación del derivado OCGLXRML en presencia de 5 mM CaCl_2 / 2.5 mM Gly	167
4.5.10 Estabilidad térmica a diferentes valores de pH de las preparaciones RML en presencia o ausencia de CaCl_2 y glicina.....	169

4.5.11 Efecto de los cationes Ca^{2+} y Mn^{2+} sobre la estabilidad térmica a pH 7 de los diferentes biocatalizadores de RML	170
4.5.12 Estabilidad en presencia de acetonitrilo de las diferentes preparaciones de RML	172
4.5.13 Efecto del CaCl_2 y MnCl_2 sobre la estabilidad en medio orgánico de las diferentes preparaciones de RML	173
4.6 CONCLUSIONES	175
5. RECOMENDACIONES	177
BIBLIOGRAFÍA	178
ANEXOS	200
DIVULGACIÓN	201

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Métodos de inmovilización reversible e irreversible.	25
Figura 2. Función biológica de las lipasas. Hidrólisis de triglicéridos.	30
Figura 3. Reacciones catalizadas por lipasas.	31
Figura 4. Mecanismo de activación interfacial de las lipasas.	32
Figura 5. Equilibrio conformacional en medios acuosos de las lipasas.	33
Figura 6. Conformación estructural de la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> (RML).	35
Figura 7. Mecanismo catalítico de las lipasas.	37
Figura 8. Modulación de las propiedades catalíticas a través de la Ingeniería del derivado.	45
Figura 9. Aminación química de grupos carboxilo con etilendiamina (EDA)	49
Figura 10. Adsorción de lipasas sobre estructuras hidrofóbicas.	50
Figura 11. Metodología propuesta para el estudio de la inmovilización de lipasas sobre diferentes soportes.	55
Figura 12. Cinéticas de inmovilización de PCL (A) y TLL (B) sobre CNBr-agarosa a diferentes concentraciones de buffer.	61
Figura 13. Cinéticas de inmovilización de PCL (A) y TLL (B) sobre Octil-agarosa a diferentes concentraciones de buffer.	62
Figura 14. Cinéticas de inhibición de TLL inmovilizada sobre CNBr (A) u Octil (B) agarosa mediante D-pNPP en diferentes concentraciones de buffer.	64
Figura 15. Cinéticas de inhibición de PCL inmovilizada sobre CNBr (A) u Octil (B) agarosa mediante D-pNPP en diferentes concentraciones de buffer.	65
Figura 16. Hidrólisis de mandelato de metilo y de p-NPB.	68

Figura 17. Estabilidad de diferentes biocatalizadores en presencia de diferentes sales de cloro 5 mM preparadas en Tris HCl 5 mM a pH 7.	71
Figura 18. Estabilidad de diferentes biocatalizadores de RML en presencia de diferentes sales de cloro 5 mM preparadas en Tris HCl 5 mM a pH 7.....	73
Figura 19. Estabilidad de diferentes biocatalizadores de CRL en presencia de diferentes sales de cloro 5 mM preparadas en Tris HCl 5 mM a pH 7.....	74
Figura 20. Estabilidad de diferentes preparaciones de RML en presencia de diferentes sales de cloro 5 mM preparadas en acetato de sodio 5 mM a pH 5.	77
Figura 21. Estabilidad de diferentes preparaciones de CRL en presencia de diferentes sales de cloro 5 mM preparadas en acetato de sodio 5 mM a pH 5.	78
Figura 22. Efecto de la concentración de Mn^{2+} o Ca^{2+} sobre la estabilidad de OCRML y OCCRL.....	80
Figura 23. Inmovilización de lipasas sobre diferentes soportes.	84
Figura 24. Metodología general propuesta para el estudio de los nuevos biocatalizadores inmovilizados sobre diferentes soportes	86
Figura 25. Reactivación de lipasas inmovilizadas sobre OCGLX agarosa mediante la técnica de desplegamiento y replegamiento de proteínas.	87
Figura 26. Preparación de los soportes glioxil.	88
Figura 27. Oxidación del soporte OC para obtener el soporte OCGLX agarosa ...	97
Figura 28. Cinéticas de inmovilización de las diferentes lipasas sobre el soporte glioxil agarosa.	99
Figura 29. Cinéticas de inmovilización de las diferentes lipasas sobre los soportes octil y octil-glioxil agarosa.	101
Figura 30. Efecto de la incubación a pH 10 sobre las enzimas inmovilizadas sobre el soporte OCGLX agarosa.....	103
Figura 31. Análisis mediante SDS-PAGE de los diferentes biocatalizadores.	105

Figura 32. Formación reversible de iminas.	106
Figura 33. Análisis mediante SDS-PAGE de los diferentes biocatalizadores Octil-lipasa luego de su inactivación en presencia de solventes orgánicos a pH 7, 30°C y 8 horas.	112
Figura 34. Análisis mediante SDS-PAGE de los diferentes biocatalizadores Octil-lipasa luego de su inactivación térmica a diferentes valores de pH y temperatura durante 8 horas.	113
Figura 35. Ciclos de desplegamiento y replegamiento de los diferentes biocatalizadores de CALB.	118
Figura 36. Ciclos de desplegamiento y replegamiento de los diferentes biocatalizadores de TLL.	120
Figura 37. Ciclos de inactivación, desplegamiento y replegamiento de los diferentes derivados de CALB.	122
Figura 38. Ciclos de inactivación, desplegamiento y replegamiento de los diferentes derivados de TLL.	123
Figura 39. Estrategia de inmovilización de lipasas aminadas y no-aminadas sobre el soporte OCGLX agarosa.	131
Figura 40. Metodología general para el estudio del efecto de la modificación química en fase sólida.	132
Figura 41. Cinética de inmovilización de las diferentes lipasas sobre el soporte glioxil agarosa a pH 5.	141
Figura 42. Cinética de inmovilización de las diferentes lipasas sobre el soporte glioxil agarosa a pH 9.	143
Figura 43. Cinética de inmovilización de las diferentes lipasas sobre el soporte glioxil agarosa a pH 10.	144
Figura 44. Cinética de inmovilización de las diferentes lipasas aminadas sobre el soporte octil agarosa a pH 5.	146

Figura 45. Cinética de inmovilización de las diferentes lipasas aminadas sobre el soporte octil-glioxil agarosa a pH 5.	147
Figura 46. Efecto de la incubación a pH 9 y pH 10 sobre la actividad enzimática de las diferentes lipasas aminadas y no-aminadas inmovilizadas sobre el soporte octil-glioxil agarosa.	148
Figura 47. Análisis SDS-PAGE de los derivados aminados y no-aminados de CALB incubados a pH 9 y 10 y reducidos con borohidruro de sodio a diferentes tiempos.	150
Figura 48. Análisis SDS-PAGE de los derivados aminados y no-aminados de RML incubados a pH 9 y 10 y reducidos con borohidruro de sodio a diferentes tiempos.	151
Figura 49. Análisis SDS-PAGE de los derivados aminados y no-aminados de TLL incubados a pH 9 y 10 y reducidos con borohidruro de sodio a diferentes tiempos.	152
Figura 50. Modelo de estructura 3D de la superficie de CALB (conformación abierta) indicando los residuos lisínicos y los ácidos carboxílicos.	155
Figura 51. Modelo de estructura 3D de la superficie de TLL (conformación abierta) indicando los residuos lisínicos y los ácidos carboxílicos.	156
Figura 52. Modelo de estructura 3D de la superficie de RML (conformación abierta) indicando los residuos lisínicos y los ácidos carboxílicos.	157
Figura 53. Efecto de CaCl_2 sobre la estabilidad de los derivados OCRML (Panel A) y OCCRL (Panel B) a pH 10.	166
Figura 54. Efecto de CaCl_2 en la inactivación del derivado OCGLXRML a pH 10.	168
Figura 55. Inactivación térmica de las diferentes preparaciones de RML.	170
Figura 56. Efecto de los cationes Ca^{2+} y Mn^{2+} sobre la inactivación térmica de diferentes preparaciones de RML.	171

Figura 57. Inactivación en acetonitrilo de los diferentes derivados RML.	173
Figura 58. Efecto de los cationes sobre la inactivación en acetonitrilo de las diferentes preparaciones de RML.	174

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los soportes.....	24
Tabla 2. Datos estructurales y especificidad de algunas lipasas fúngicas.	34
Tabla 3. Tiempos de vida media (en minutos) de los derivados de PCL y TLL inmovilizados sobre CNBr y OC inhibidos irreversiblemente mediante D-pNPP. ..	65
Tabla 4. Actividad de las diferentes preparaciones de PCL y TLL frente al mandelato de metilo a pH 7 y diferentes condiciones.....	68
Tabla 5. Efecto de los diferentes cationes sobre la actividad de los derivados Octil-lipasa frente al mandelato de metilo <i>R</i> o <i>S</i>	81
Tabla 6. Vida media (en minutos) de los diferentes biocatalizadores inactivados térmicamente.	108
Tabla 7. Vida media (en minutos) de los diferentes biocatalizadores inactivados en solventes orgánicos.	109
Tabla 8. Actividad de los diferentes biocatalizadores frente a <i>R/S</i> mandelato de metilo (50 mM) y hexanoato de etilo (25 mM) a pH 7 y 25°C.	115
Tabla 9. Actividad de los diferentes biocatalizadores en la hidrólisis de <i>R</i> y <i>S</i> mandelato de metilo (50 mM) a pH 7 y 25°C.	125
Tabla 9. Residuos aminoacídicos en la cara del centro activo de CALB, RML y TLL y su porcentaje de accesibilidad relativa (ASA) al medio.....	154
Tabla 10. Vida media (en minutos) de los diferentes biocatalizadores inactivados térmicamente.	159
Tabla 11. Vida media (en minutos) de los diferentes biocatalizadores incubados en solventes orgánicos a 30°C.	160
Tabla 12. Efecto de las diferentes concentraciones de acetonitrilo sobre la actividad de los biocatalizadores lipásicos.....	162

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Determinación de la actividad enzimática	200
---	-----

RESUMEN

TÍTULO: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPASAS MICROBIANAS INMOVILIZADAS SOBRE NUEVOS SOPORTES OCTIL-AGAROSA HETEROFUNCIONALES*

AUTOR: NAZZOLY RUEDA ARANGO**

Palabras clave: soportes heterofuncionales, inmovilización, lipasas, modificación química, reactivación, cationes, desplegamiento/replegamiento.

Descripción: Las enzimas son biocatalizadores muy útiles, aunque en la mayoría de los casos deben ser mejoradas para su aplicación industrial. Por ejemplo, es preciso inmovilizarlas para su fácil recuperación y posible reuso. Esta necesidad ha hecho que la inmovilización se utilice para mejorar otras propiedades de las enzimas. Entre las enzimas más utilizadas destacan las lipasas.

Las lipasas mantienen un equilibrio entre dos diferentes estructuras conformacionales, una abierta y la otra cerrada, donde el centro activo puede estar aislado del medio mediante una cadena polipeptídica. La forma abierta es inestable en medio acuoso, pero es estabilizada mediante adsorción sobre cualquier superficie hidrofóbica. Esto ha permitido que las lipasas se inmovilicen, purifiquen, hiperactiven y estabilicen por inmovilización reversible sobre soportes hidrofóbicos, como por ejemplo perlas de octil-agarosa. A pesar de su utilidad, este soporte, libera la enzima en condiciones drásticas de operación, limitando su utilidad.

En consecuencia, en este trabajo de tesis doctoral, se diseñó un nuevo soporte heterofuncional (octil-glioxil agarosa), mediante la oxidación directa de los dioles presentes en el soporte comercial octil-agarosa, para generar uniones covalentes que impidan la desorción y lograr la estabilización de las lipasas. Se evaluaron las condiciones óptimas de inmovilización sobre este nuevo soporte y se dio solución a problemas generados durante el proceso mediante la modificación química en fase sólida de las lipasas y el uso de sales como agentes estabilizantes. Los resultados obtenidos mostraron que los biocatalizadores inmovilizados sobre el nuevo soporte heterofuncional mejoraron significativamente las propiedades biocatalíticas de las enzimas comparadas con los respectivos soportes monofuncionales.

*Tesis Doctoral

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Doctorado en Química. Directora: PhD. Claudia Ortiz. Codirectores: PhD. Rodrigo Torres y PhD. Roberto Fernández-Lafuente.

ABSTRACT

TITLE: CHARACTERIZATION OF MICROBIAL LIPASES IMMOBILIZED ON NEW OCTYL-AGAROSE HETEROFUNCTIONAL SUPPORTS

AUTHOR: NAZZOLY RUEDA ARANGO

Keywords: heterofunctional supports, immobilization, lipases, chemical modification, reactivation, cations, unfolding/refolding.

Abstract: Enzymes are very useful biocatalysts, although in most cases they should be improved for their industrial application. For instance, it is necessary to immobilize them for their recovery and possible reuse. This need has made that the immobilization is used to improve some properties of the enzymes. Among the most commonly used enzymes, lipases are included.

Lipases keep a balance between two different conformational structures, one open and the other one closed, wherein the active center can be isolated from the means by a polypeptide chain. The open form is unstable in aqueous means, but is stabilized by adsorption on any hydrophobic surface. This has allowed that lipases are immobilized, purified, hyperactivated and stabilized by reversible immobilization on hydrophobic supports, such as octyl-agarose beads. Despite of its usefulness, this support also releases the enzyme in drastic operating conditions limiting its use.

Consequently, in this doctoral thesis, a new heterofunctional support (octyl-glyoxyl agarose) was designed, by the direct oxidation of the diols present in the octyl-agarose commercial support, in order to generate some covalent linkages that avoid desorption and achieve stabilization of immobilized lipases. The optimal conditions for the immobilization of each lipase on this new support were evaluated and some of the problems generated during the immobilization process were solved by using a solid-phase chemical modification of lipases and using some salts as stabilizing agents. The results showed that new biocatalysts immobilized on the new hetero-functional support significantly improved the biocatalytic properties of enzymes compared to monofunctional supports.

*Doctoral thesis

**Science Faculty. School of Chemistry. Doctorate in Chemistry. Director: PhD. Claudia Ortíz. Codirectors: PhD. Rodrigo Torres and PhD. Roberto Fernández-Lafuente.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. BIOTECNOLOGÍA ENZIMÁTICA

Las enzimas son catalizadores biológicos que permiten que las reacciones químicas del metabolismo celular ocurran a una velocidad significativa en condiciones ambientales extremadamente suaves, compatibles con la mantención de la viabilidad celular. El uso de enzimas con propósitos tecnológicos supone hacer de estos catalizadores fisiológicos catalizadores de proceso, capaces de transformar materias primas en productos con valor agregado. El uso eficiente de las enzimas, separadas del sistema celular donde se originan, bajo condiciones artificiales de proceso es el objetivo de la biotecnología de enzimas (Guisán J. M., 2006).

Las enzimas son aparentemente catalizadores ideales dada su elevada especificidad, alta eficiencia en la conversión sustrato-producto y elevada actividad en condiciones ambientales moderadas, lo que les abre una amplia gama de posibilidades de aplicación. No obstante, las enzimas presentan ciertas desventajas asociadas principalmente a su origen biológico lo que dificulta su uso en reacciones de relevancia a nivel industrial. Desventajas tales como: i) Inactivación en condiciones drásticas de reacción (elevados valores de pH y temperatura, presencia de codisolventes), ii) Inhibición por altas concentraciones sustratos y productos, iii) Alta solubilidad en medios acuosos, lo que dificulta su separación del medio de reacción, incrementando con ello los costos del proceso. Por lo tanto, para la implementación de procesos industriales enzimáticos, hace necesario trabajar en el mejoramiento de sus propiedades biocatalíticas. En consecuencia, el desarrollo de estrategias que posibiliten la obtención de catalizadores con propiedades biocatalíticas mejoradas es un requerimiento

indispensable para su uso en reacciones específicas de gran relevancia (Guisán J. M., 2006).

1.1 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

La inmovilización de enzimas se refiere al confinamiento o asociación física de la proteína a una región definida del espacio con retención de su actividad catalítica, generando un nuevo biocatalizador (enzima inmovilizada) que presenta las siguientes ventajas:

- Reutilización o uso continuo
- Fácil separación del medio de reacción
- Prevención de contaminación de la enzima
- Posible estabilización de la estructura tridimensional de la enzima

Las propiedades de los biocatalizadores están determinadas por las características de la enzima, las del soporte empleado para la inmovilización y por las condiciones del medio de reacción. Las interacciones enzima-soporte dan lugar a un derivado enzimático con propiedades químicas, bioquímicas y mecánicas específicas (Tischer y Kasche, 1999). El tipo de soporte, el método de inmovilización, la carga enzimática, los grupos reactivos del soporte, el pH, la temperatura y el tiempo de reacción son factores que determinan la velocidad y el rendimiento de la inmovilización (Buchholz, 1979).

1.1.1 Tipos de soporte

Las propiedades de un soporte “ideal” incluyen una elevada resistencia mecánica, química y biológica; insolubilidad; hidrofiliidad; alta área específica; regenerabilidad; y bajo costo. Aunque no existe un soporte ideal universal, se

debe elegir cuidadosamente la mejor alternativa en cada situación específica para obtener el mejor desempeño de los biocatalizadores (Guisán J. M., 2006).

Los soportes pueden ser clasificados como orgánicos e inorgánicos de acuerdo con su composición química (**Tabla 1**). Los soportes orgánicos presentan una buena relación área-volumen (alta capacidad de carga), son muy flexibles y en algunos casos su costo es muy bajo (residuos orgánicos). Los soportes inorgánicos son generalmente más resistentes, más regenerables y sus propiedades físicas (ej. porosidad) pueden ser fácilmente controladas (Guisán J. M., 2006).

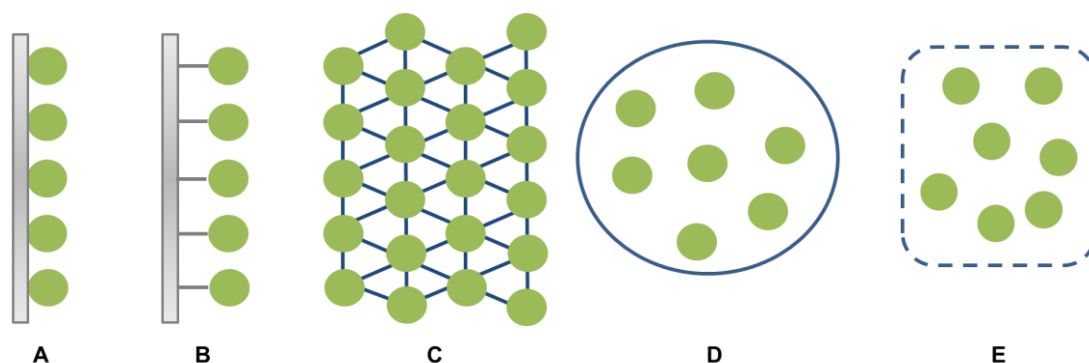
Tabla 1. Clasificación de los soportes.

Orgánicos	Inorgánicos
Polímeros Naturales: • Polisacáridos: celulosa, dextranos, agar, agarosa • Proteínas: colágeno, albúmina • Carbón Polímeros sintéticos: • Poliestireno • Otros polímeros: vinil, poliacrilato, polimetacrilatos, poliacrilamida, poliamidas	Minerales naturales: bentonita, sílica. Materiales procesados: vidrio (no poroso y de poro controlado), metales, óxidos metálicos de poro controlado.

1.1.2 Métodos de inmovilización

Usualmente las enzimas son inmovilizadas al soporte mediante interacciones entre los residuos aminoacídicos de la molécula proteica y los grupos funcionales del soporte. Una forma de clasificar los métodos de inmovilización es según el tipo de interacción físico-química entre la enzima y el soporte (**Figura 1**).

Figura 1. Métodos de inmovilización reversible e irreversible. A) Adsorción, B) Unión covalente, C) Entrecruzamiento, D) Encapsulación y E) Retención por membranas.



En esta tesis doctoral, nos centraremos en dos tipos de interacciones enzima-soporte, generadas por los grupos funcionales presentes y/o incluidos sobre el soporte, la unión covalente y la adsorción.

1.1.2.1 Unión covalente: método de inmovilización irreversible

El método de inmovilización mediante enlaces covalentes supone que una vez la enzima está unida al soporte, ya no podrá ser separada sin llevar a cabo la destrucción de la actividad biológica de la enzima y el soporte. Uno de los

procedimientos más comunes de inmovilización enzimática irreversible es la unión covalente (**Figura 1**) (Buchholz y col., 2005).

La unión covalente se produce entre los grupos funcionales de un soporte activado y los residuos aminoacídicos de la molécula enzimática (grupos $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, etc.). Existen diversos tipos de reacciones químicas que se han utilizado en la unión covalente de enzimas a soportes activados, como la acilación, la alquilación, la diazotación y la disulfuración. Una ventaja de este método es que la enzima no es liberada al medio de reacción, lo cual se debe a la naturaleza estable de los enlaces formados entre la enzima y el soporte. La inmovilización covalente es recomendable únicamente si la interacción enzima-soporte no es lo suficientemente fuerte para retener la proteína, provocando su liberación al medio de reacción, o si se consigue una gran estabilización de la enzima mediante unión covalente multipuntual (Srere y Uyeda, 1976; Guisán, 2006). Su principal desventaja es que al ser un método irreversible, una vez la enzima se ha inactivado, el soporte no puede ser reutilizado y por consiguiente debe ser descartado.

La estabilización de la enzima es uno de los problemas críticos en el diseño de biocatalizadores. Por ello, la mayoría de las estrategias para la estabilización de la proteína están basadas en la prevención de la distorsión de su estructura tridimensional (3D). Por ello, la unión covalente multipuntual es considerada una de las estrategias que ha ofrecido los mejores resultados para solucionar este problema. Este comportamiento puede deberse a una conformación más rígida de la proteína, generada por numerosas interacciones que unen la enzima al soporte insoluble. De esta manera se previenen cambios conformacionales que varían dependiendo de la posición de los residuos implicados en la inmovilización (Guisán, 2006).

1.1.2.2 Adsorción: método de inmovilización reversible

Los métodos de inmovilización reversibles permiten la liberación o desorción de la enzima inmovilizada del soporte tras su inactivación; y posteriormente, el soporte puede ser reutilizado. La adsorción se refiere a la interacción enzima-soporte mediante enlaces de puente de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones tanto hidrofóbicas como iónicas. La naturaleza de las fuerzas involucradas mediante adsorción, sugiere que el proceso puede ser revertido cambiando las condiciones que generan las fuerzas de interacción (ej. pH, fuerza iónica, temperatura o polaridad del solvente). Aunque es un método de inmovilización sencillo y preserva la actividad catalítica de las enzimas, presenta desventajas tales como la liberación de la enzima al medio de reacción cuando las interacciones son relativamente débiles o las condiciones de operación son drásticas. Por otro lado, la rigidificación de las moléculas de enzima es poco factible dada la naturaleza débil de las interacciones enzima-soporte (Guisán, 2006).

La adsorción hidrofóbica se ha utilizado como un principio cromatográfico durante más de tres décadas, teniendo en cuenta variables experimentales bien conocidas, tales como el pH, la fuerza iónica y la temperatura. La fuerza de interacción se basa tanto en la hidrofobicidad del adsorbente como la de la proteína. La hidrofobicidad del adsorbente puede ser regulada por el grado de sustitución del soporte y por el tamaño de la molécula del ligando hidrófobo (Guisán, 2006).

1.1.3 Inmovilización sobre soportes heterofuncionales

Un soporte heterofuncional, para la inmovilización de enzimas, se puede definir como el que posee funcionalidades distintas en su superficie, en ocasiones introducidas por diseño (pero en muchas ocasiones ignoradas en el diseño del

protocolo de inmovilización), capaces de interactuar con una proteína bajo diferentes condiciones.

Algunas de las más antiguas estrategias de inmovilización covalente son basadas en el uso de características multifuncionales del soporte. Estas características muchas veces se han pasado por alto durante la aplicación del soporte, haciendo los resultados finales de difícil comprensión. En este sentido, los soportes activados con glutaraldehído son los más antiguos, poseen una matriz con grupos amino, una cadena hidrofóbica y además pueden interaccionar de forma covalente con los grupos amino primario de las enzimas (Barbosa y col., 2013).

Otros soportes heterofuncionales clásicos son los soportes comerciales epoxi que constan de grupos epoxi reactivos covalentes en una matriz hidrófoba. En este caso, la inmovilización se lleva a cabo a alta fuerza iónica para permitir la adsorción de proteínas, de modo que la unión covalente puede tener lugar en una etapa posterior.

La inmovilización sobre un soporte heterofuncional puede comenzar a través de diferentes causas y puede implicar diferentes zonas de la superficie de la enzima en función del grado de activación y las condiciones de la inmovilización. A partir de las técnicas de inmovilización de enzimas, nuevos soportes heterofuncionales se han diseñado para permitir un control más estricto del proceso de inmovilización de enzimas. Mateo y colaboradores (2010), diseñaron un protocolo de inmovilización de dos etapas sobre soportes heterofuncionales de agarosa. En el primer paso, las enzimas fueron inmovilizadas a pH 7 mediante adsorción física, y en el segundo paso, las lipasas inmovilizadas fueron incubadas bajo condiciones alcalinas para promover una unión covalente multipuntual intramolecular, entre los grupos glioxil del soporte y los grupos amino en la superficie de la enzima. Algunos resultados interesantes de esta inmovilización covalente multipuntual fueron reportados: se mejoró la estabilidad de la tannasa de *Lactobacillus*

plantarum y de la quimotripsina de páncreas bovino, al igual que se logró aumentar la actividad y enantioselectividad de la lipasa de *Geobacillus thermocatenulatus* (BTL2).

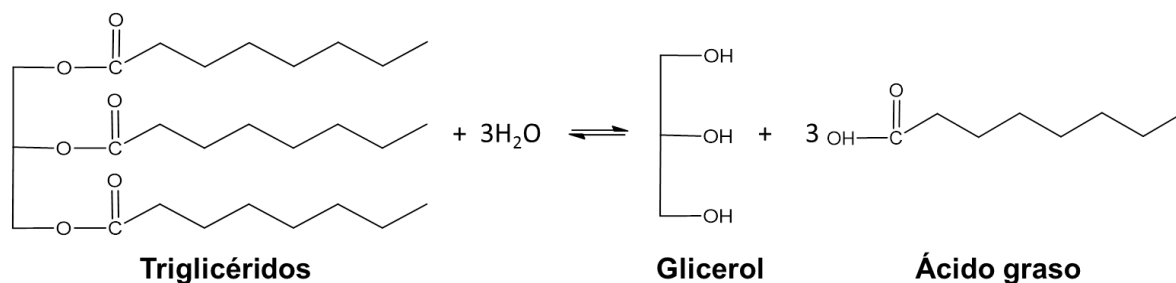
Bernal y colaboradores (2014), desarrollaron tres tipos de soportes heterofuncionales mediante modificación química de sílica: uno hidrofílico con grupos glioxil, otro hidrofóbico con grupos octil, y por último uno tanto hidrofílico como hidrofóbico con grupos glioxil y octil, respectivamente. Estos nuevos soportes fueron empleados para la evaluación del efecto de diferentes superficies químicas en la inmovilización de dos tipos de lipasas, *Pseudomonas stutzeri* (PsL) y *Alcaligenes* sp. (AsL). Los soportes presentaron resultados promisorios en la inmovilización de estas lipasas permitiendo la obtención de biocatalizadores activos y estables en la síntesis de palmitato de lactulosa.

1.2 LIPASAS

1.2.1 Generalidades

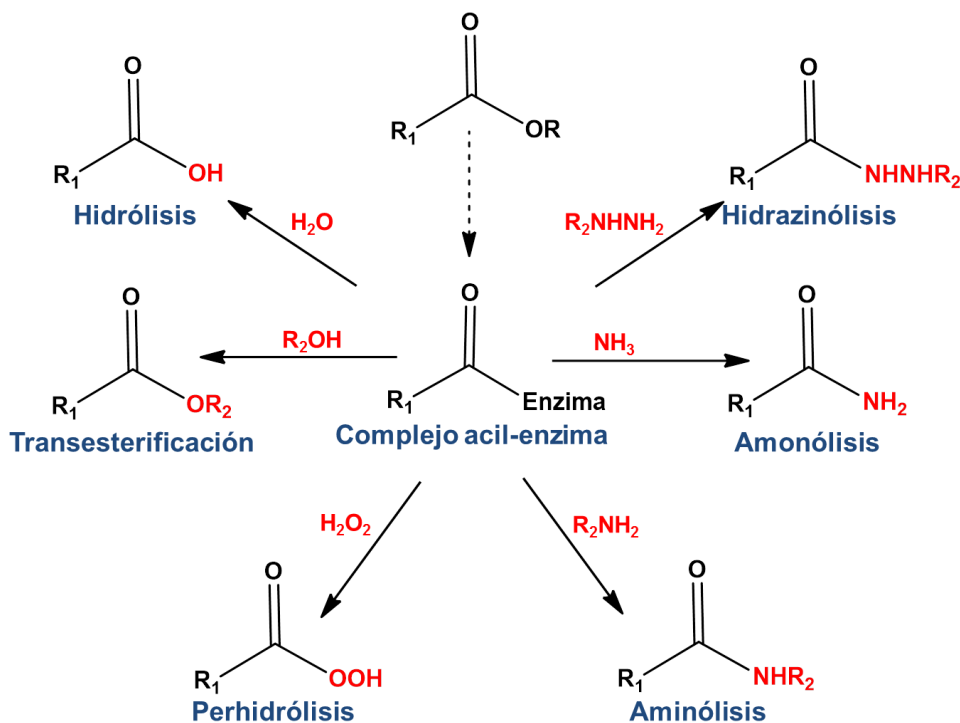
Las lipasas (EC 3.1.1.3, triacilglicerol lipasa) pertenecen a la familia de las serina-hidrolasas y son las enzimas que catalizan la hidrólisis de grasas y aceites con la posterior liberación de ácidos grasos libres, diglicéridos, monoglicéridos y glicerol (**Figura 2**). Están ampliamente distribuidos en plantas, animales y microorganismos, donde su función fisiológica es metabolizar lípidos. Estas enzimas se obtienen ya sea por extracción de tejido animal o vegetal o cultivo de microorganismos (Jaeger, Dijkstra y Reetz, 1999).

Figura 2. Función biológica de las lipasas. Hidrólisis de triglicéridos.



Las lipasas son enzimas con un gran interés en química fina ya que presentan una amplia especificidad al mismo tiempo que una elevada regio y enantioselectividad/especificidad. Estas propiedades han convertido a las lipasas en las enzimas con mayor uso en biotransformaciones, ya que son capaces de catalizar diversas reacciones químicas (**Figura 3**) que incluyen: reacciones de hidrólisis; reacciones de esterificación selectiva entre ácidos y alcoholes (Ortega y col., 2012; Wang y col., 2013); reacciones de transesterificación catalizando el intercambio de grupos acilo ya sea entre un éster y un ácido carboxílico (acidólisis) (Xiong y col., 2012; Ray y col., 2013), un éster y otro éster (interesterificación), o un éster y un alcohol (alcoholólisis) (Santaniello y col., 2006; Gotor-Fernández y col., 2006; Ahmed y col., 2012). Además, las lipasas catalizan reacciones de aminólisis para síntesis de amidas, tanto racémicas como ópticamente activas (Gotor-Fernández y col., 2006; Prechter y col., 2012) y la hidrazinólisis selectiva de ésteres para la formación de hidrazinas (Hacking y col., 2000).

Figura 3. Reacciones catalizadas por lipasas.

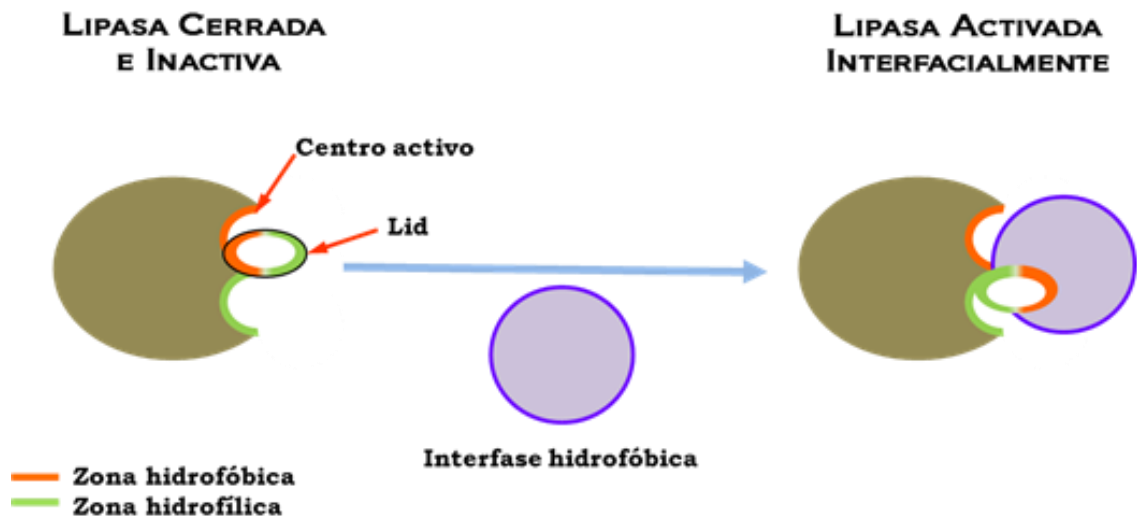


Las lipasas catalizan naturalmente la hidrólisis del enlace éster de los tri-, di-, y monoglicéridos en ácidos grasos y glicerol. Sin embargo, son activas frente a un amplio rango de sustratos. En su función fisiológica, la reacción es llevada a cabo en la interface de un sistema bifásico de reacción, el cual resulta por la presencia de una fase orgánica inmiscible con el sustrato hidrofóbico en presencia de agua (Verger, 1997).

Los microorganismos son capaces de producir diferentes tipos de enzimas lipolíticas, la principal característica de las lipasas es su capacidad de activación en presencia de interfases hidrofóbicas, a lo cual se le denomina “activación interfacial” (Derewenda y col., 1992; Verguer, 1997). Esta activación interfacial puede ser promovida por diferentes interfases hidrofóbicas: gotas de aceite,

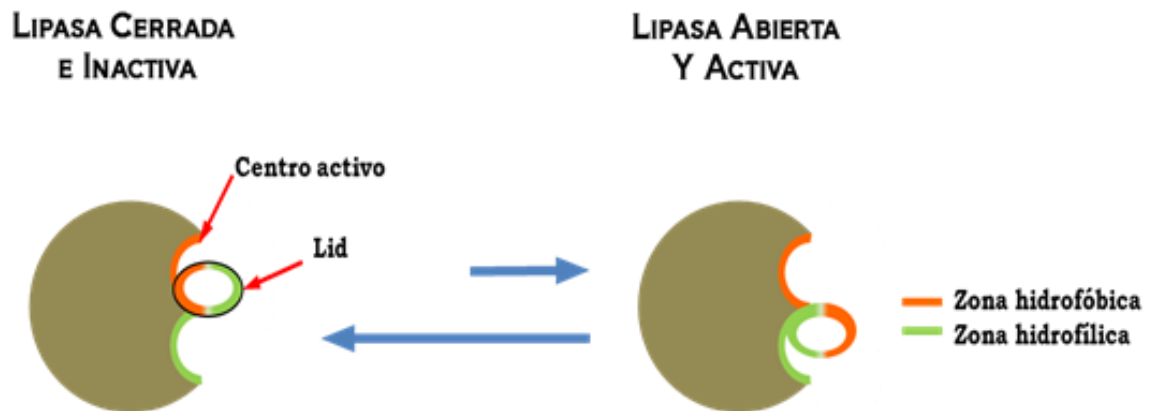
soportes de superficie hidrofóbicas, burbujas de gas, proteínas hidrofóbicas, lipopolisacáridos, etc. (Palomo y col., 2003) (**Figura 4**).

Figura 4. Mecanismo de activación interfacial de las lipasas.



Las lipasas presentan un elemento diferenciador que no se conoce en otro grupo de enzimas. Dicho elemento es una “tapadera” o “lid”, formada por una porción helicoidal de la cadena polipeptídica, que se sitúa sobre el centro activo de la enzima en su conformación inactiva. Las lipasas presentan dos conformaciones diferentes, denominadas forma cerrada y forma abierta. Cuando el centro activo de la enzima está protegido del medio de reacción por el lid, se considera que la enzima está inactiva (forma cerrada), cuando se desplaza y el centro activo queda expuesto al medio de reacción, la enzima adquiere la conformación activa (forma abierta). En medio acuoso, las moléculas de lipasas se encuentran en equilibrio entre estas dos formas (**Figura 5**), con el equilibrio desplazado hacia la forma cerrada. Este intercambio entre la forma abierta y la cerrada está acompañada de complejos cambios conformacionales (Derewenda, 1992).

Figura 5. Equilibrio conformacional en medios acuosos de las lipasas.



Las lipasas constituyen un grupo de biocatalizadores muy versátiles puesto que son estables en disolventes orgánicos, no requieren cofactores, poseen un amplio rango de especificidad de sustrato y presentan una alta enantioselectividad (Jaeger y Eggert, 2002). Además, pueden ser producidas en grandes cantidades, ya que la mayoría se obtienen con gran rendimiento a partir de microorganismos tales como hongos o bacterias. La resolución de la estructura tridimensional de algunas lipasas también está facilitando considerablemente el diseño de estrategias que conducen a una mejora en las propiedades catalíticas de estas enzimas (Jaeger y Eggert, 2002).

1.2.2 Estructura de las lipasas

La resolución de la primera estructura tridimensional de las lipasas de *Rhizomucor miehei* y páncreas humano, permitió identificar la presencia de un elemento móvil conocido como “lid” o “tapadera”, compuesto de una secuencia peptídica anfifílica de α -hélice que cubre el sitio activo (Schmid R. y Verger, 1998) y se encuentra unida a la estructura lipásica mediante elementos flexibles. El *lid*, que descubre el sitio activo en presencia de una interface lípido-agua, genera un cambio

conformacional (activación interfacial) que permite el acceso del sustrato al sitio activo. Cuando la interfase está ausente, la entrada del sitio activo se encuentra bloqueada y la enzima es inactiva (Casas-Godoy y col., 2012). En la **Tabla 2**, se observan algunas de las lipasas de naturaleza fúngica, que son estudiadas en este trabajo (Casas-Godoy, 2012 y Kapoor, 2012).

Tabla 2. Datos estructurales y especificidad de algunas lipasas fúngicas.

Lipasa	Especificidad	PDB*	Triada Catalítica	Lid
Candida antarctica A	Trans específica	2VEO 3GUU	S184, D334, H366	217-308
Candida antarctica B	1,3 – regioespecífica	1TCA 1TCB 1TCC 1LBS 1LBT 3ICV 3ICW	S105, D187, H224	-
Candida rugosa	No-específica	1CRL 1TRH 1LPN 1LPO 1LPP 1LPM 1LPS	S209, E341, H449	E66-P92
Rhizomucor miehei	1,3 – regioespecífica	1TGL 3TGL 4TGL 5TGL	S144, D203, H257	S83-P96
Thermomyces lanuginosus	1,3 – regioespecífica	1TIB 1DT3 1DT5 1DTE 1DU4 1EIN 1GT6	S146, D201, H258	R84-F95

*Protein Data Bank (www.rcsb.org)

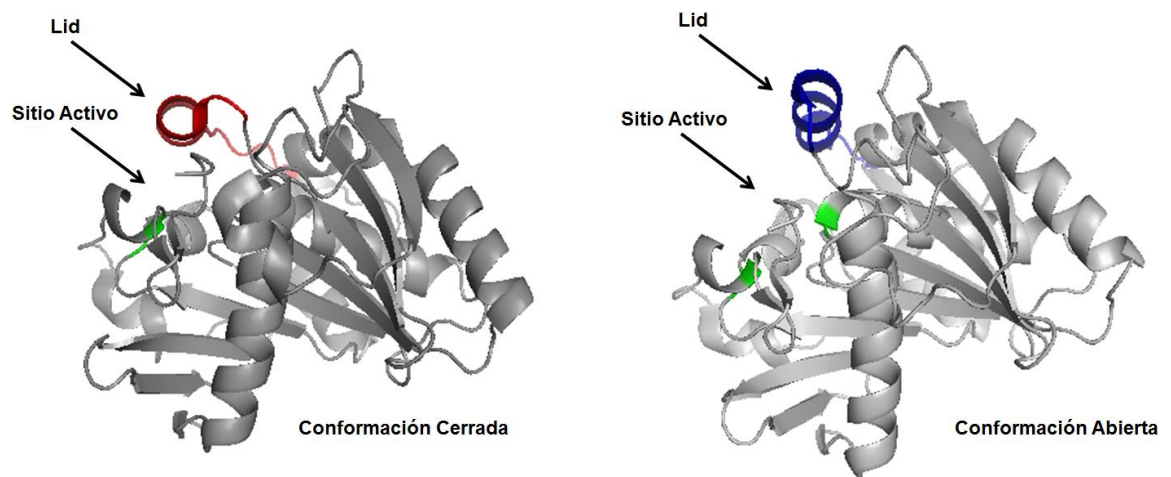
Estructuralmente, las lipasas presentan una configuración α/β hidrolasa, es decir, poseen una estructura que se compone de un núcleo predominante de láminas β paralelas que se encuentran rodeadas por α -hélices (Derewenda y col., 1992; Grochulsky y col., 1993; Ericsson y col., 2008). El sitio activo de las lipasas está formado por una triada catalítica constituida por Serina (Ser, S), Histidina (His, H)

y otro aminoácido que suele ser Ácido Aspártico (Asp, D) o Ácido Glutámico (Glu, E), que se encuentran en una cavidad conocida como hueco hidrofóbico.

En la **figura 6** se observa la estructura tridimensional de la lipasa de *Rhizomucor miehei* en su conformación abierta que permite el acceso del sustrato y su conformación cerrada que lo obstruye.

Figura 6. Conformación estructural de la lipasa de *Rhizomucor miehei* (RML).

Tomado de Protein Data Bank. Conformación abierta: PDB 4TGL, Conformación cerrada: PDB 3TGL.



El sitio activo de las lipasas está localizado dentro de un bolsillo en la parte superior de la hoja β central de la estructura proteica. La superficie del bolsillo consta principalmente de residuos hidrofóbicos capaces de interactuar con el sustrato hidrofóbico. El sitio activo difiere entre lipasas en su forma, tamaño, profundidad del bolsillo y las características fisicoquímicas de sus aminoácidos (Pleiss y col. 1998).

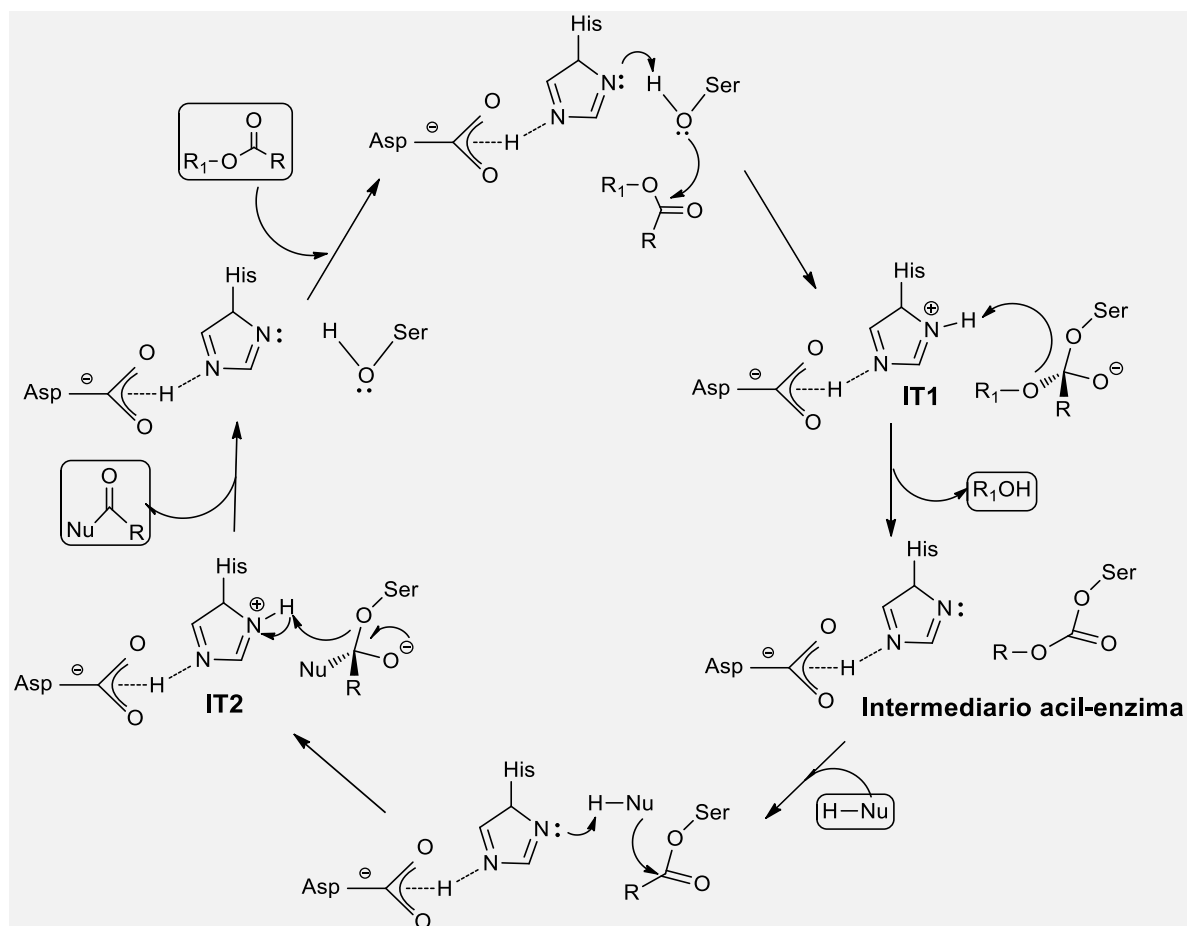
1.2.3 Mecanismo catalítico de las lipasas

El mecanismo catalítico de las lipasas se inicia una vez el sustrato se sitúa en el sitio activo formando inicialmente el complejo enzima-sustrato. Este complejo es formado a través de la triada catalítica de las lipasas como se describe a continuación:

El ácido aspártico polariza el grupo imidazol de la histidina, lo que facilita la transferencia de protones a través de puentes de hidrógeno. Posteriormente, el protón hidroxílico de la serina, se une a la histidina. La serina activada es capaz de atacar el compuesto carbonílico, formando el primer intermediario tetraédrico (IT1), en el que el oxianión del sustrato se estabiliza por interacciones con la cadena proteica. Posteriormente, se produce la transferencia de un protón de la serina al residuo de histidina, para ser cedido al átomo de oxígeno del grupo saliente del sustrato. Esta transferencia provoca la descomposición del intermediario tetraédrico 1 para generar el *complejo acil-enzima*. A continuación, tiene lugar el ataque del nucleófilo correspondiente, con lo cual se genera un segundo intermediario tetraédrico (IT2), que colapsa en el producto de reacción y regenera la serina, para comenzar un nuevo ciclo catalítico (**figura 7**) (Lutz, 2004; Kwong y col., 2007).

Además, la enzima posee un ambiente quiral específico en el centro activo que favorece la selectividad. Esta propiedad biocatalítica puede manifestarse durante la formación del complejo acil-enzima, durante el posterior ataque del nucleófilo o en ambos momentos (Lutz, 2004; Kwong y col., 2007).

Figura 7. Mecanismo catalítico de las lipasas.



1.2.4 Lipasas de *Candida antarctica*

La levadura de *C. antarctica* es una de las 154 especies del género *Candida* sp. Originalmente, fue aislada del lago Vanda, en la Antártica, que se encuentra cubierto de hielo perenne. Debido a las diversas publicaciones sobre las aplicaciones de las lipasas y el gran interés por estos biocatalizadores, la producción de lipasas de *C. antarctica* se ha optimizado y dos isoenzimas, llamadas lipasas A y B (CALA y CALB, respectivamente) que se han caracterizado y purificado.

1.2.4.1 Lipasa A de *Candida antarctica* (CALA)

La lipasa A de *C. antarctica* (CALA), es la isoenzima de esta especie que ha recibido menor atención comparada con la isoenzima B (CALB). Esto es un poco sorprendente, ya que CALA es capaz de mantener su actividad hidrolítica en solventes orgánicos a mayores temperaturas y sobre un amplio rango de pHs comparada con CALB. La secuencia N-terminal de las lipasas A y B es conocida por no ser homólogas entre sí. Además, CALA presenta una mayor activación interfacial que CALB (Domínguez y col., 2005; Ericsson y col., 2008; Kirk y col., 2002).

Probablemente, la propiedad bioquímica más sorprendente es su alta termoestabilidad, ya que expresa actividad eficientemente a temperaturas mayores de 90°C, lo cual la convierte en una de las lipasas más termoestables. CALA, es una enzima dependiente del calcio, posee un peso molecular de 45 kDa, un pH óptimo aproximado de 7 y un punto isoeléctrico (PI) de 7.5 (Kirk y col., 2002).

CALA muestra una alta selectividad para la N-acilación de β -amino ésteres en condiciones experimentales en las que otras hidrolasas conducirían a una competencia entre la N-acilación en el grupo amino y la transesterificación en el grupo éster. Esta capacidad hace de ella un catalizador muy útil en la producción de aminoácidos enantioméricamente puros y de otras moléculas relacionadas (Domínguez y col., 2005; Kirk y col., 2002).

Otra característica importante, es su capacidad de aceptar alcoholes con alto impedimento estérico, lo cual no es común entre las hidrolasas. Por tanto, representa una línea de investigación prometedora, ya que tales estructuras voluminosas son útiles como bloques de construcción en química orgánica. Aunque las lipasas son selectivas hacia los ácidos grasos *cis* y en la hidrólisis de

triglicéridos poseen una preferencia *sn*-1,3 (relacionada a la posición del ácido graso en la molécula de glicerol), CALA posee una alta selectividad hacia los ácidos grasos *trans* y se considera como un biocatalizador no selectivo respecto a la hidrólisis de triglicéridos (Domínguez y col., 2005; Kirk y col., 2002).

1.2.4.2 Lipasa B de *Candida antarctica* (CALB)

La lipasa B de *Candida antarctica* presenta un peso molecular de 33 kDa y un punto isoeléctrico de 6.0. Exhibe una especificidad posicional de tipo *sn*-3 en la hidrólisis de triglicéridos (Kirk, 2002). La secuenciación de CALB ha revelado que su estructura primaria está formada por 317 residuos, los cuales se pliegan en un modelo de α/β hidrolasa. Su sitio activo consiste de una triada catalítica de serina, histidina y aspartato (Uppenberg y col., 1994).

Al interior de su estructura posee dos α -hélices móviles que rodean el sitio activo ($\alpha 5$ y $\alpha 10$), particularidad que le permite a la enzima acomodar los diferentes sustratos (Zisis y col., 2015). Skjot y colaboradores (2009), realizaron diversas simulaciones para resaltar el papel crucial de la hélice $\alpha 5$ en la interacción de CALB con interfaces hidrofóbicas, pero los resultados no representaron una prueba inequívoca de que la $\alpha 5$ tiene una función similar al *lid* de las demás lipasas. A pesar de este gran avance en la comprensión y el control de la actividad catalítica de CALB, aún se encuentra en discusión la funcionalidad del *lid* en la estructura de la enzima.

Por otra parte, Zisis y colaboradores (2015), sugieren que la CALB es una enzima que se activa interfacialmente, por lo tanto su actividad catalítica dependerá de la hidrofobicidad de la interfase y del tamaño del sustrato.

La CALB es un biocatalizador muy utilizado debido a su gran regio y enantioselectividad. Ha sido empleada como un catalizador regioselectivo,

principalmente, para llevar a cabo la acilación de diferentes carbohidratos (Anderson y col., 1998; Kolodziejska y col., 2012). Sin embargo, la principal aplicación ha sido en la resolución racémica de alcoholes, aminas y ácidos, o en la preparación de compuestos ópticamente activos. Los compuestos ópticamente activos y puros que se obtienen mediante esta ruta enzimática, son difíciles de producir mediante otras rutas sintéticas alternativas de alto costo. Debido a la alta especificidad de esta lipasa hacia un sustrato, esta enzima puede ser empleada en un sin número de reacciones sintéticas que lleven a la formación de estructuras menos complejas. La CALB en inmovilizada exhibe una gran estabilidad frente a un amplio rango de valores de pH y temperatura. De esta forma, se ha implementado su uso en diferentes reacciones orgánicas, incluyendo procesos biocatalíticos a escala comercial (Escorcía y col., 2011; Kirk y col., 2012).

1.2.5 Lipasa de *Candida rugosa* (CRL)

La lipasa de *Candida rugosa* fue producida, en los años sesenta, a partir de esta levadura aislada a partir de los suelos naturales, debido a su alta capacidad de producción. Luego, dos isoenzimas (LipA y LipB) fueron identificadas, purificadas y caracterizadas genéticamente. Sin embargo, a la fecha, se conocen al menos siete isoenzimas de lipasa de *C. rugosa*, siendo solo cinco de ellas bioquímicamente caracterizadas (Lip 1 – Lip 5) (Domínguez y col., 2006).

Actualmente, las muestras comerciales de CRL se presentan como mezclas de las isoenzimas en proporciones variables, las cuales han sido generadas modificando las condiciones de fermentación. La presencia de estas isoenzimas, en diferentes proporciones, conlleva a una de las principales causas de la poca reproducibilidad de los resultados obtenidos cuando se trabaja con las lipasas de *C. rugosa* en medios orgánicos ligeramente hidratados. Confirmando así, que cada isoenzima posee propiedades biocatalíticas diferentes (Domínguez y col. 2006).

Todas las isoenzimas de CRL que han sido caracterizadas, están compuestas por el mismo número de aminoácidos (534) y comparten una alta homología entre ellas (>70%), a pesar de poseer diferentes puntos de glicosilación y/o porcentaje de carbohidratos. Además, todas las isoenzimas tienen una estructura α/β hidrolasa, con una triada catalítica (Ser-209, Glu-341, His-449) y un *lid* (residuos 65 – 94) que cubre el sitio activo cuando la enzima está en su forma cerrada o inactiva. La composición aminoacídica del *lid* es variable entre las isoenzimas, ya que solo 14 residuos se conservan en las estructuras de Lip1, Lip2 y Lip3, lo cual es crucial para la activación interfacial de la enzima y consecuentemente para la actividad catalítica enzimática y/o su enantioselectividad (Domínguez y col. 2006).

La CRL es una lipasa no específica hacia una amplia gama de ácidos grasos de cadenas largas y presenta una baja actividad en la obtención de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL). Por tanto, CRL ha sido usada en la industria alimenticia para la obtención de AGPICL como: el eicosapentaneoico, docosahexaenoico o gamma-linoleico, a partir de aceites de pescado o microalgas marinas (Domínguez y col., 2006).

1.2.6 Lipasa de *Rhizomucor miehei* (RML)

La lipasa de *Rhizomucor miehei*, al igual que las demás lipasas, es una proteína de estructura tipo α/β , en la que se alternan las dos estructuras: fragmentos con estructura de α -hélice y de lámina β . Dichos fragmentos se disponen de forma que las láminas β se ubican en la zona central hidrofóbica y las α -hélices se disponen alrededor para proteger y estabilizar la estructura proteica. Su estructura, fue la primera en ser elucidada mediante difracción de rayos X (**Figura 6**) (Rodrigues y col., 2010a; Rodrigues y col., 2010b; López-Belmonte, 1996), permitiendo conocer su mecanismo de activación interfacial y por ende, el mecanismo de activación de las lipasas en general.

La RML está constituida por una cadena proteica sencilla, compuesta por 269 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 31kDa y un pI de 3.8. Su triada catalítica está formada por Ser-144, His-257 y Asp-203. Esta enzima es más específica para los triglicéridos que contienen ácidos grasos de bajo peso molecular y posee una especificidad posicional de tipo *sn*-3 en la hidrólisis de triglicéridos (Rodrigues y col., 2010b).

A pesar de que la RML fue diseñada y principalmente producida para la modificación de grasas y aceites, se han encontrado muchas más aplicaciones en la industria alimenticia. Su uso en la industria se debe principalmente a su alta estabilidad en sistemas anhidros, donde presenta mayores ventajas, comparada con otras lipasas. Estas ventajas son reforzadas por su alta actividad en esterificaciones llevadas a cabo en medios anhidros, por lo cual es una de las lipasas elegida para las esterificaciones o en cualquier reacción que proceda vía esterificación en alguna de las etapas iniciales (ej. acidólisis e interesterificación) (Rodrigues y col., 2010a; Rodrigues y col., 2010b).

La RML, en cuanto a su selectividad de reacción, se describe como *sn*-1,3 específica. Entre estas dos posiciones, la enzima exhibe una preferencia *sn*-1 o *sn*-3 dependiendo de la reacción. En la hidrólisis, la RML prefiere la posición *sn*-1, esto significa que en la acidólisis e interesterificación (donde el primer paso es la hidrólisis del triglicérido) es principalmente *sn*-1 específica. Sin embargo, en la esterificación, la enzima presenta una ligera preferencia *Sn*-3 (Rodrigues y col., 2010a; Rodrigues y col., 2010b).

1.2.7 Lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL)

La lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) es secretada por un hongo filamentoso y termofílico del cual lleva su nombre. Además, es un polipéptido de una sola cadena con un peso molecular de 31.7 kDa, posee un pI de 4.4, es una

enzima muy estable, mantiene su actividad a 55 - 60°C y presenta un máximo de actividad alrededor de pH 9 (Fernandez-Lafuente, 2010; Perez y Moreno, 2006).

El centro activo de TLL comprende el residuo de Ser 146, His 258 y Asp 201 de la cadena aminoacídica. Se ha caracterizado tanto su forma cerrada como abierta, mostrando claramente el movimiento de la tapadera para exponer el centro activo a potenciales sustratos.

En general, las lipasas tienden a formar agregados bimoleculares (dímeros) que confrontan sus sitios activos abiertos. La TLL es una de las lipasas con mayor tendencia a formar este tipo de agregados. Este hecho se debe tener en cuenta al evaluar las propiedades de esta enzima, ya que tanto el monómero como el dímero posee características biocatalíticas (actividad, estabilidad y selectividad) diferentes (Palomo y col., 2003). El uso de detergentes sobre esta enzima permite el rompimiento de las interacciones enzima-enzima, produciendo la forma monomérica que se ha descrito como más activa y menos estable. Además, los detergentes también pueden estabilizar la forma abierta de esta enzima. Estos dos hechos pueden explicar el incremento en la actividad de la TLL en presencia de concentraciones moderadas de detergentes (Palomo y col., 2003; Fernandez-Lafuente, 2010).

La alta actividad y estabilidad de la TLL ha permitido su uso en la mayoría de los medios de reacción, desde medios bifásicos (agua - solvente orgánico) hasta en reacciones libres de solventes. Por ejemplo, TLL ha catalizado reacciones en presencia de líquidos iónicos (sales orgánicas que a temperatura ambiente son líquidos), microemulsiones de agua en líquidos iónicos (un nuevo medio microheterogéneo) donde retuvo alrededor del 90% de su actividad luego de diez ciclos de uso (Pavlidis y col., 2009) e incluso, en fluidos súper críticos (Karmee y col., 2008).

1.2.8 Modulación de las propiedades catalíticas de las lipasas

Los grandes cambios conformacionales que sufren las lipasas, se deben a un gran número de fuerzas inter- e intra- moleculares, que sugieren la posibilidad de preparar o diseñar nuevos biocatalizadores a través de estrategias de inmovilización que permitan la modulación de sus propiedades catalíticas. La ingeniería de proteínas pretende alcanzar este objetivo mediante la modificación química de residuos aminoácidos superficiales de la enzima, la ingeniería del medio de reacción y la ingeniería del derivado.

1.2.8.1 Ingeniería del medio de reacción

Los cambios en las condiciones del medio, en el que se encuentren las lipasas, pueden alterar de forma significativa el balance de las interacciones que genera cada una de sus conformaciones estructurales. Por ejemplo, los disolventes pueden favorecer el bolsillo hidrofóbico y fortalecer las interacciones electrostáticas; el pH puede alterar el tipo y cantidad de interacciones entre el *lid* y el resto de la superficie de la proteína; y la fuerza iónica puede desfavorecer la presencia del bolsillo hidrofóbico y debilitar las interacciones entre el *lid* y el resto de la proteína, entre otras. De esta manera se sugiere, que las condiciones experimentales afectan de forma considerable no solo el equilibrio entre la conformación abierta y cerrada de las lipasas, sino también la forma del centro activo y por tanto, sus propiedades catalíticas (Pan y col., 2010; Barbosa y col., 2011; Marciello y col., 2012).

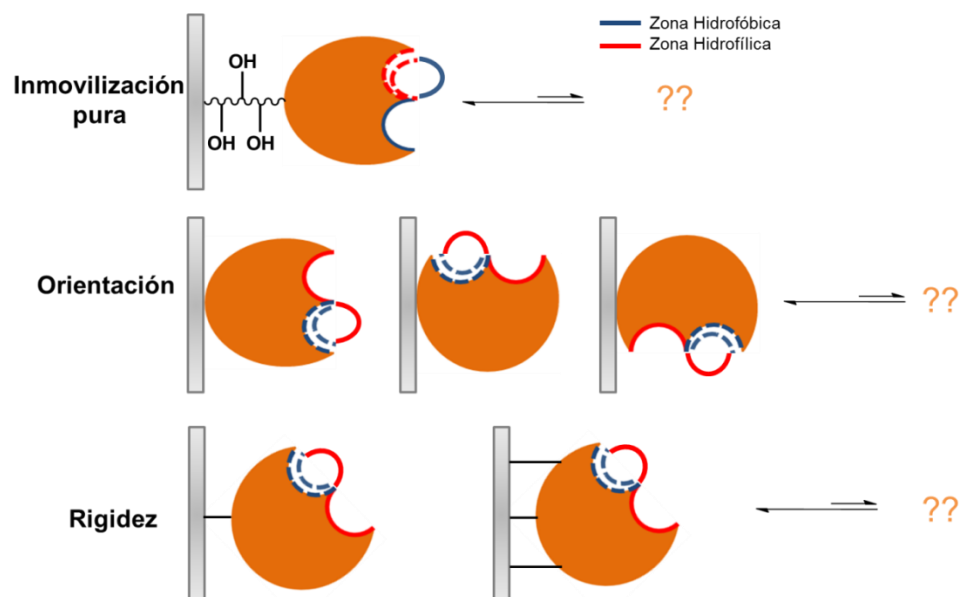
La modulación de las propiedades catalíticas de las lipasas mediante la modificación de las condiciones del medio de reacción se ha denominado “ingeniería del medio de reacción”. Esta estrategia se ha empleado para modular el comportamiento de diferentes enzimas que presentan grandes cambios

conformacionales durante la catálisis, como por ejemplo la penicilina G acilasa (Terreni y col., 2001; Rocchietti y col., 2002; Delorme y col., 2011).

1.2.8.2 Ingeniería del derivado

El desarrollo de diversas estrategias de inmovilización sobre una gran variedad de soportes activados con diferentes grupos funcionales, ha permitido la implementación de metodologías que permiten la inmovilización de proteínas de forma controlada y dirigida a través de diferentes zonas de su superficie (aquellas con mayor densidad de cargas positivas o negativas, las zonas más hidrofóbicas). Además, el grado de activación del soporte y las condiciones de inmovilización permiten controlar el grado de unión enzima-soporte y por lo tanto la rigidez de la zona inmovilizada (**Figura 8**) (Palomo y col., 2003; Mateo y col., 2007; Barbosa y col., 2010; Hernández y col., 2011; Marciello y col., 2012; Rodrigues y col., 2012).

Figura 8. Modulación de las propiedades catalíticas a través de la Ingeniería del derivado.



Las lipasas han sido parte de numerosas investigaciones que han demostrado la efectividad de la ingeniería del derivado en la modulación de sus propiedades catalíticas, entre las cuales se pueden resaltar los siguientes trabajos:

- La lipasa B de *Candida antarctica* fue purificada e inmovilizada mediante los siguientes protocolos: adsorción interfacial sobre soportes de glioxil-agarosa, adsorción iónica en soportes rodeados con polietilenimina (PEI) e inmovilización covalente sobre soportes activados con glutaraldehído. El derivado obtenido por adsorción interfacial presentó la mayor actividad en la hidrólisis de sustratos simples (butirato de etilo). Sin embargo, el derivado CALB-soporte-PEI fue el más activo en presencia de sustratos iónicos (ácido 2-fenil-2-butirolacético) o mandelato de metilo (Palomo y col., 2002).
- Las propiedades catalíticas de la lipasa de *Rhizomucor miehei* fueron modificadas mediante inmovilización directa en resinas epóxido heterofuncionales, para la producción del enantiómero S del ácido 2-fenil-2-butirol-acético (pureza del 90% y enantioselectividad de 59), utilizando el derivado sobre un soporte activado con grupos carboxilos provenientes del ácido iminodiacético (IDA-Sepabeads) (Palomo y col., 2003).
- Othman y col., 2008, lograron una producción altamente enantioselectiva de (R)-butirato de metilo utilizando lipasa de *Candida rugosa* (CRL) inmovilizada sobre soportes activados con grupos epóxidos. El compuesto mencionado fue obtenido con una pureza del 100% con la CRL inmovilizada en soportes epóxidos de Eupergit C.
- El uso de glutaraldehído en la inmovilización de CALB permitió una alta versatilidad en la variación de las condiciones experimentales durante la

inmovilización, generando: interacciones covalentes usando sal y un detergente, intercambio iónico usando un detergente no iónico y activación interfacial usando sal. Esta variedad de biocatalizadores fueron obtenidos partiendo de un mismo soporte y se observaron cambios dramáticos al ser comparados entre sí, principalmente en su especificidad frente a pNPB y la hidrólisis de metil mandelato (Barbosa y col., 2012).

- Feng y col., 2013 inmovilizaron la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) sobre un soporte de lana activado con polientilenimina (PEI) y glutaraldehído. Los resultados mostraron un incremento en la estabilidad y actividad retenida por el derivado de PFL con respecto a la enzima soluble e inmovilizada sobre lana no activada.
- Diferentes lipasas fueron inmovilizadas sobre un soporte de agarosa activado con divinilsulfona. El uso de este nuevo soporte muestra como la modulación de las propiedades catalíticas de diferentes lipasas pueden ser alteradas mediante el cambio del valor del pH en su inmovilización (Dos Santos y col., 2015).

1.2.8.3 Modificación química de proteínas

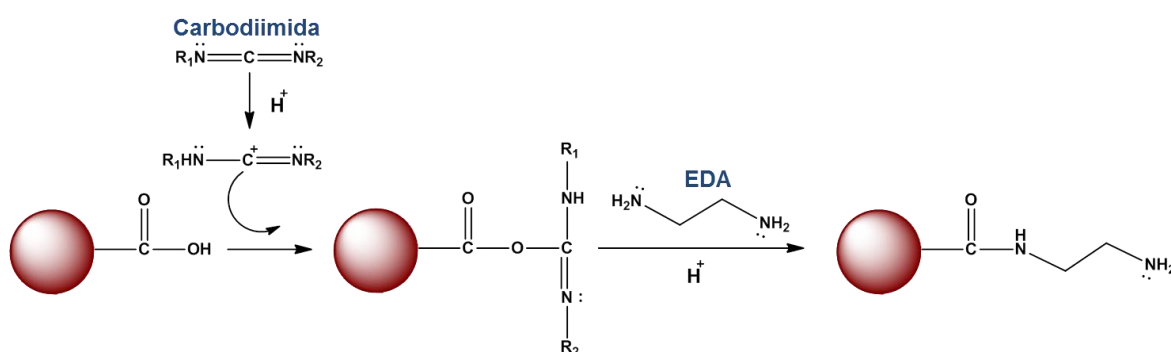
La modificación química posee ciertas ventajas. En primer lugar, no es necesario conocer la estructura tridimensional de la proteína; como la enzima se encuentra plegada, la estructura terciaria se mantiene estable a pesar de la alteración química. En segundo lugar, permite la introducción de grupos reactivos que pueden presentar propiedades distintas a las de los aminoácidos naturales. Este cambio global en la química de la superficie de la proteína puede alterar en gran medida sus propiedades biocatalíticas (Rodrigues y col., 2011; Fernández-Lorente y col., 2011; Marciello y col., 2012).

La predicción del efecto final de la modificación química sobre las propiedades de la enzima suele ser complejo, ya que es probable que los efectos positivos se limiten únicamente a ciertas condiciones experimentales (Rodrigues y col., 2011; Rodrigues y col., 2014). Además, si la modificación química es realizada sobre una enzima soluble, es posible que las propiedades biocatalíticas se vean afectadas de manera adversa, debido a las condiciones generalmente drásticas de la modificación (pH y concentración de agentes modificantes). En este sentido, la modificación química de enzimas previamente inmovilizadas presenta una serie de ventajas asociadas a la química en fase sólida con respecto a la modificación de moléculas solubles (Orzáez y col., 2007; Rodrigues y col., 2011; Rodrigues y col., 2014). Por ejemplo:

- El control efectivo de las condiciones de reacción y el grado de modificación química de la enzima. Al encontrarse la enzima inmovilizada, se facilita su remoción del medio, lo cual permite controlar los tiempos de reacción.
- Una vez la enzima ha sido inmovilizada, se evita que precipite por las condiciones de reacción (pH o presencia de solventes orgánicos) de la modificación química. De esta manera, algunas modificaciones que son muy difíciles de llevar a cabo en solución pueden ser fácilmente realizadas en fase sólida.
- Si la enzima es previamente estabilizada por la inmovilización, es posible disminuir cualquier efecto negativo de la modificación química sobre la actividad enzimática. La superficie del soporte puede proteger algunos grupos químicos importantes para la catálisis de la enzima (por ejemplo, grupos del sitio activo), al generar impedimentos estéricos que dificultan el acceso del agente modificante (Rodrigues y col., 2011; Rodrigues y col., 2014).

En general, es posible realizar diferentes modificaciones químicas dependiendo de los grupos funcionales que se introduzcan a la superficie enzimática. Entre las modificaciones químicas se encuentra la aminación química de grupos carboxilo con etilendiamina (EDA); en la cual, los grupos carboxílicos (aspárticos, glutámicos y carboxilo terminal) de las proteínas pueden ser transformados en aminas primarias, mediante la activación con 1-etil-3-(di-metil-amino propil) carbodiimida (EDAC). En este proceso se forma una amida entre el grupo carboxilo activado de la proteína y uno de los grupos amino de etilendiamina (EDA) que actúa como nucleófilo, dejando un grupo amino primario libre (**figura 9**) (Carraway y Koshland, 1972; López-Gallego y col., 2005; Grazú y col., 2006).

Figura 9. Aminación química de grupos carboxilo con etilendiamina (EDA)

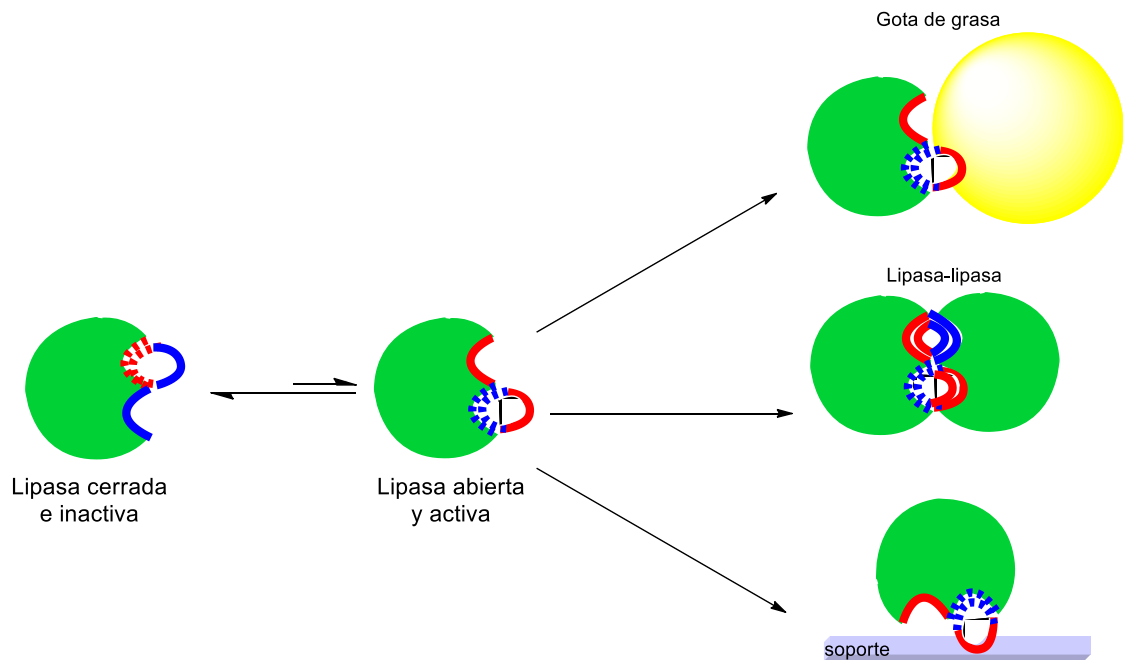


El grupo amino introducido presenta valores de pKa (aproximadamente de 9), menor a los pKa de los ϵ -amino nativos de la proteína (con pKa de 10.7). Estos nuevos grupos amino además de ser más reactivos, permiten realizar reacciones de modificación a valores de pH más bajos (Carraway y Koshland, 1972; López-Gallego y col., 2005; Grazú y col., 2006; Rodrigues y col., 2011 y 2014).

1.2.9 Inmovilización de lipasas sobre estructuras hidrofóbicas

Las lipasas son enzimas que exhiben una alta afinidad por cualquier estructura de naturaleza hidrofóbica cuando se encuentra en medios con baja fuerza iónica dado su peculiar mecanismo de acción descrito anteriormente (**figura 10**). De esta manera, se han desarrollado métodos eficientes de inmovilización reversible y específicos para estas enzimas (Bastida y col., 1998; Palomo y Guisan, 2012). En este sentido, las lipasas han sido inmovilizadas sobre diferentes soportes de agarosa activados con grupos hidrofóbicos (Octil, butil, entre otros) a través de adsorción interfacial (Fernandez-Lafuente y col., 1998; Sabuquillo y col., 1998; Cuhna y col., 2008). Se postula que las lipasas inmovilizadas en estos soportes presentan la forma abierta estabilizada, lo que puede permitir hiperactivaciones con sustratos hidrofóbicos.

Figura 10. Adsorción de lipasas sobre estructuras hidrofóbicas.



Adicionalmente, la inmovilización sobre estructuras hidrofóbicas a baja fuerza iónica se ha convertido en un método eficiente de purificación de lipasas ya que bajo esta condición son las únicas proteínas que se adsorben sobre este tipo de soportes. Sabuquillo y col., 1998, purificaron a través de cromatografía de afinidad interfacial preparados comerciales de lipasas de *Rhizopus niveus* (RNL) y *Candida rugosa* (CRL) sobre soportes hidrofóbicos activados con butil, fenil y octil-agarosa, a baja fuerza iónica. Los resultados obtenidos mostraron que bajo esta condición, no se presentaba la adsorción de otras enzimas como las esterasas. Sin embargo, las lipasas se adsorbían rápidamente y podían ser separadas posteriormente a través de su desorción y purificación con tritón X-100.

Las lipasas inmovilizadas en este tipo de soportes suelen tener una estabilidad elevada que supera, en muchos casos, la de catalizadores conseguidos por unión covalente multipuntual. Este hecho peculiar se ha explicado porque la forma abierta adsorbida tiene una estabilidad muy superior a la de la forma en equilibrio.

De acuerdo con lo anterior, la inmovilización de las lipasas sobre soportes hidrofóbicos constituye una poderosa herramienta que permite en un único paso la purificación, inmovilización e hiperactivación interfacial al fijar la conformación abierta de la lipasa sobre el soporte, siendo además un método reversible. Sin embargo, la inmovilización en soportes hidrofóbicos no es compatible con medios que presenten un elevado contenido en disolventes orgánicos.

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, se propuso como objetivo principal de esta tesis doctoral el diseño de un nuevo soporte heterofuncional que en una primera etapa permitiera fijar y estabilizar la conformación abierta e hiperactiva de lipasas a través de la inmovilización mediante adsorción sobre los grupos hidrofóbicos del soporte (octil-agarosa); y en una segunda etapa, permitiera estabilizar la forma previamente hiperactivada de la enzima, evitando la desorción o liberación de la lipasa, a través de interacciones covalentes entre la

enzima y los grupos funcionales introducidos químicamente en el soporte sintetizado.

2. INMOVILIZACIÓN Y ESTABILIZACIÓN EN PRESENCIA DE CATIONES DE LA CONFORMACIÓN ABIERTA DE LAS LIPASAS OBTENIDA MEDIANTE ADSORCIÓN INTERFACIAL SOBRE SOPORTES HIDROFÓBICOS

2.1 INTRODUCCIÓN

Como se ha expuesto anteriormente (sección 1.3), el complejo mecanismo catalítico presente en las lipasas hace posible pensar que la alteración de este mecanismo de apertura y cierre o de la forma exacta de la conformación abierta de la lipasa, podría dar lugar a una modificación en las propiedades catalíticas de la misma. De esta forma, la posibilidad de controlar y modular este equilibrio se puede convertir en una poderosa herramienta de mejora de las propiedades de las lipasas como enzimas de interés industrial.

Teniendo en cuenta los cambios conformacionales que sufren las lipasas y el gran número de fuerzas de interacción que están implicadas en el mantenimiento de la estructura de las diferentes conformaciones, es evidente que un cambio en las condiciones del medio puede alterar de forma significativa todo el balance de estas interacciones. En consecuencia, las condiciones experimentales deberían afectar no solo al equilibrio entre la conformación abierta y cerrada de la lipasa, sino también a sus propiedades catalíticas.

Por lo anterior, una variación en la fuerza iónica puede desfavorecer la exposición del bolsillo hidrofóbico, mientras que la presencia de detergentes permite su estabilización (Fernandez-Lorente y col., 2007; Mogensen y col., 2005; Hermoso y col., 1996). Además, la presencia de otros agentes estabilizantes (ej. sales), en el medio de inmovilización, pueden generar un efecto variable dependiendo del método de inmovilización; ya sea la lipasa activada interfacialmente frente a una superficie hidrofóbica o sobre soportes que involucren el equilibrio conformacional

de la enzima (ej. Covalentes). Las enzimas pueden ser precipitadas en presencia de sales (disociadas en cationes multivalentes). En el caso de las lipasas, se presencia una tendencia a formar agregados bimoleculares (Fernandez-Lorente y col., 2003; Palomo y col., 2005).

En este estudio, se evaluó el efecto de la fuerza iónica durante la inmovilización de lipasas sobre el soporte Octil-agarosa (donde la forma abierta de la lipasa es estabilizada) y el soporte Bromo cianógeno-agarosa (CNBr) (donde el equilibrio conformacional se mantiene mediante un enlace covalente unipuntual). Además, se estudió el efecto de sales cloradas sobre la estabilidad de diferentes biocatalizadores lipásicos: enzimas libres y enzimas inmovilizadas covalentemente en CNBr e inmovilizadas sobre Octil-agarosa.

2.2 MATERIALES

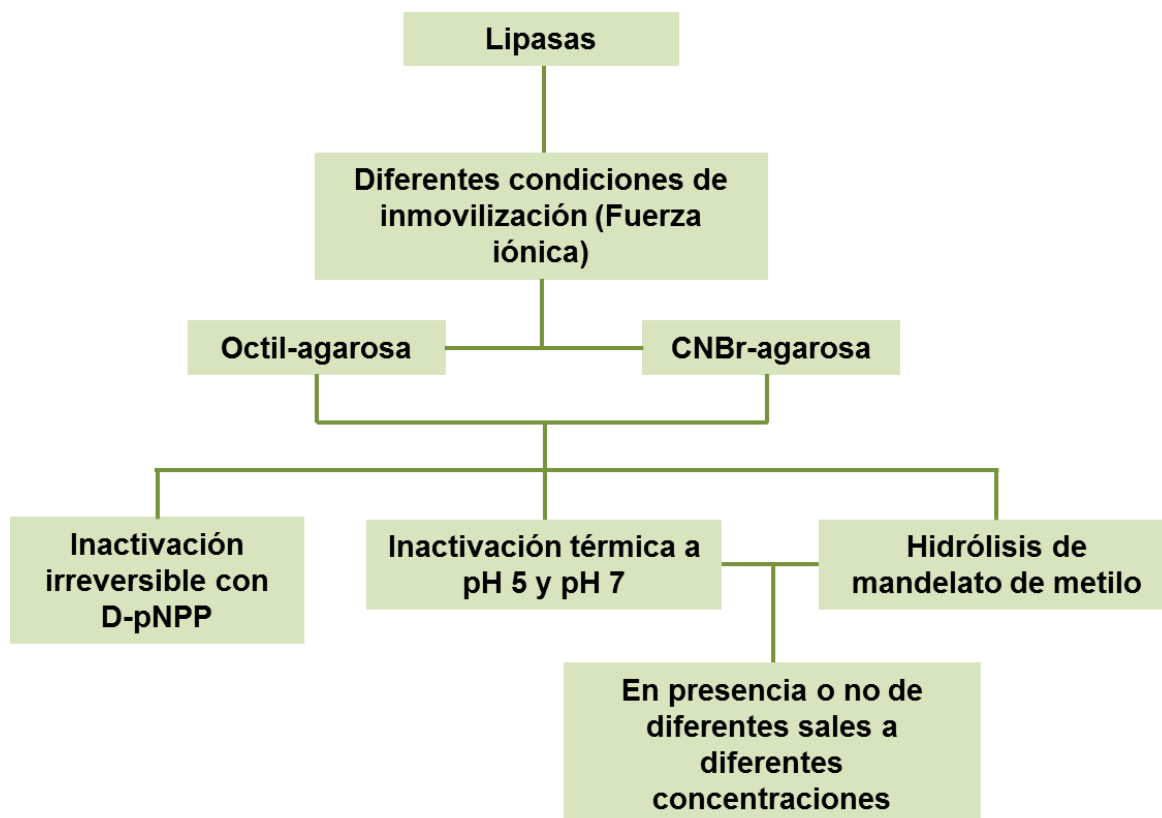
Las soluciones de lipasas A y B de *Candida antarctica* (CALA y CALB), *Rhizomucor miehei* (RML), *Thermomyces lanuginosus* (TLL) y Lecitasa fueron obtenidas de Novozymes (España). La lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PCL) (polvo liofilizado) fue obtenida de Amano. La lipasa de *Candida rugosa* (CRL) (polvo liofilizado), el p-nitrofenilbutirato (p-NPB), Tritón X-100, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), mandelato de metilo y dietil p-nitrofenilfosfato (D-pNPP) fueron obtenidos de Sigma Aldrich (St. Louis, Mo, USA). Los soportes Octil-agarosa 4BCL y Bromo cianógeno-agarosa 4B (CNBr) fueron adquiridos de GE Healthcare. Todos los reactivos y solventes utilizados fueron de grado analítico.

2.3 MÉTODOS EXPERIMENTALES

La metodología general propuesta y desarrollada se presenta en la **figura 11**. Inicialmente las lipasas fueron inmovilizadas empleando dos estrategias: i)

mediante adsorción sobre el soporte Octil agarosa y ii) mediante unión covalente sobre el soporte Bromo cianógeno-agarosa (CNBr).

Figura 11. Metodología propuesta para el estudio de la inmovilización de lipasas sobre diferentes soportes.



La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), usando como referencia albúmina de suero bovino. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se presentan como la media de este valor con una desviación estándar, usualmente, menor al 10%.

2.3.1 Inmovilización de lipasas sobre diferentes soportes

Las enzimas fueron inmovilizadas bajo condiciones convencionales (Fernandez-Lafuente y col., 1998); las sales usadas en este estudio no fueron agregadas en este paso.

2.3.1.1 Inmovilización sobre el soporte CNBr

Antes de llevar a cabo la inmovilización en CNBr, el soporte fue sometido a un tratamiento de hidratación en medio ácido, para lo cual, 6 g de soporte seco fueron suspendidos en 42 mL de una solución de HCl 1 mM durante 15 minutos bajo agitación constante. Seguidamente, el soporte fue lavado en exceso utilizando una solución de bicarbonato 100 mM y NaCl 500 mM a pH 8.3.

Posteriormente, 5 g de CNBr-agarosa fueron adicionados a 50 mL de la solución enzimática (1 mg de proteína por g de soporte húmedo). Las diferentes soluciones enzimáticas fueron preparadas en buffer fosfato de sodio 25 mM a pH 7, conteniendo 0.1% (v/v) de Tritón X-100 (Palomo y col., 2003 y 2005); en el caso de TLL fue agregado 0.1% de CTAB y para CALB no hubo adición de detergente, durante el proceso de inmovilización. Periódicamente, se extrajeron muestras de suspensión y sobrenadante durante la inmovilización para determinar la actividad enzimática en la hidrólisis de p-NPB (sección 2.4.1). Luego de 90 minutos de agitación suave y constante a 4°C, los biocatalizadores obtenidos fueron lavados con agua destilada e incubados en una solución de etanolamina 1 M a pH 8 durante 2 horas. Finalmente, las preparaciones inmovilizadas fueron lavadas con abundante agua destilada y posteriormente almacenadas a 4°C.

Para estudiar evaluar el efecto de la fuerza iónica durante la inmovilización, la concentración de buffer se incrementó desde 10 mM hasta 1 M.

2.3.1.2 Inmovilización sobre el soporte Octil-agarosa (OC)

La inmovilización se llevó a cabo usando 1 mg de proteína por g de soporte húmedo. Las muestras comerciales de lipasas fueron disueltas en el volumen correspondiente de buffer fosfato de sodio 10 mM a pH 7. Luego, el soporte OC fue adicionado manteniendo una relación de 10 g de soporte por 100 mL de solución enzimática. La actividad del sobrenadante y suspensión fueron medidas periódicamente mediante la hidrólisis de p-NPB (sección 2.4.1). Al finalizar la inmovilización, la suspensión fue filtrada y la enzima soportada fue lavada varias veces con agua destilada y almacenada a 4°C.

Para estudiar evaluar el efecto de la fuerza iónica durante la inmovilización, la concentración de buffer se incrementó desde 10 mM hasta 1 M.

2.3.2 Inhibición irreversible de los derivados enzimáticos

Las diferentes preparaciones de lipasas inmovilizadas (1 g) fueron suspendidas en 10 mL de buffer fosfato de sodio a diferentes concentraciones (desde 10 mM a 1 M) a pH 7 y 25°C en presencia o ausencia de 0.01% de detergente (sección 2.3.1.2). Después, se agregó la suspensión el agente inhibidor (D-pNPP) a una concentración de 1 mM manteniendo agitación constante (Dos Santos y col., 2014). Periódicamente, se tomaron muestras de esta suspensión para determinar la actividad enzimática en la hidrólisis de p-NPB (sección 2.4.1).

2.3.3 Inactivación térmica de los diferentes biocatalizadores en presencia de diferentes sales

Este experimento fue realizado para determinar el efecto de las sales sobre la estabilidad enzimática. Las enzimas solubles (1 mg/mL) o 1 g de lipasas inmovilizadas fueron resuspendidas en 10 mL de buffer 5 mM de acetato de sodio

a pH 5 o TrisHCl a pH 7 e incubadas a diferentes temperaturas, conteniendo diferentes concentraciones (desde 0 hasta 25 mM) de sales cloradas (CaCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 , NaCl y KCl). Periódicamente fueron extraídas muestras de la suspensión y la actividad enzimática (expresada como actividad residual) fue determinada usando como sustrato p-NPB (sección 2.4.1). La vida media de los biocatalizadores fue calculada a partir de las cinéticas de inactivación obtenidas.

2.3.4 Hidrólisis de mandelato de metilo

La actividad enzimática de los derivados obtenidos también fue evaluada en la hidrólisis del mandelato de metilo en medio acuoso. 200 mg de enzima inmovilizada fueron adicionados a 2 mL de una solución 10 mM de *R/S* mandelato de metilo, preparada en buffer fosfato de sodio a pH 7 de diferentes concentraciones (25 – 500 mM), manteniendo agitación constante a 25 °C.

Para determinar el efecto de los cationes sobre la actividad y especificidad de la enzima frente a sustratos complejos, de naturaleza quiral, se prepararon soluciones 50 mM de *R* o *S* metil mandelato en glicina 100 mM a pH 7 conteniendo o no CaCl_2 o MnCl_2 (5 mM). La reacción fue iniciada mediante la adición de 1 g de biocatalizador a 5 mL de solución de sustrato y se mantuvo bajo agitación constante a 25 °C.

En ambos casos, el progreso de la reacción fue monitoreado extrayendo a diferentes tiempos alícuotas del medio de reacción. Posteriormente, se analizaron los productos formados y el sustrato consumido a través de HPLC en fase reversa, de acuerdo con lo descrito en la sección 2.4.2, hasta obtener conversiones entre el 10 – 15%.

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.4.1 Determinación estándar de la actividad enzimática frente al p-NPB

La actividad catalítica de las lipasas se cuantificó de forma continua a través del método de velocidades iniciales de reacción. El ensayo se llevó a cabo midiendo el incremento de absorbancia a 348 nm (punto isosbético), producido por la formación del producto p-nitrofenol en la hidrólisis de p-NPB 0.4 mM (disuelto en buffer fosfato de sodio 100 mM) a pH 7 y 25 °C ($\epsilon = 5150 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ bajo estas condiciones). Para iniciar la reacción, 50 – 200 μL de solución lipásica o suspensión se añadieron a 2.5 mL de la solución del sustrato. Una unidad de actividad enzimática (U) fue definida como la cantidad de enzima que es necesaria para hidrolizar 1 μmol de p-NPB por minuto bajo las condiciones descritas previamente.

2.4.2 Determinación del grado de hidrólisis del mandelato de metilo mediante HPLC

El grado de conversión se analizó mediante HPLC en fase reversa (Spectra Physic SP 100) acoplado a un detector UV (Spectra Physic SP 8450) y utilizando una columna Kromasil C18 (15 cm x 0.46 cm) suministrada por Análisis Vínicos (España). Las muestras fueron eluidas en una fase móvil de acetonitrilo y buffer fosfato de amonio 100 mM a pH 3.2 (en proporción 20:80, v/v) y a un flujo de 2.0 mL/min. La longitud de onda empleada en el análisis fue de 230 nm. El ácido mandélico tuvo un tiempo de retención de 2.5 min y el éster (mandelato de metilo) un tiempo de retención de 6 min.

Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de ácido mandélico por minuto bajo las condiciones descritas. La actividad fue determinada por triplicado con un máximo

de conversión del 10 – 15%, los resultados se presentan como la media de este valor.

2.5 RESULTADOS

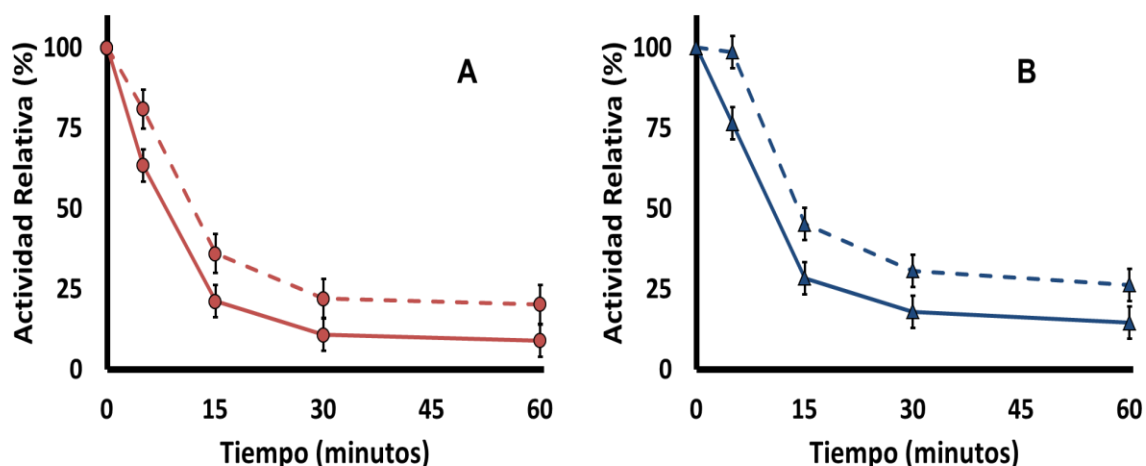
2.5.1 Efecto de las condiciones experimentales sobre la inmovilización de lipasas utilizando CNBr y OC agarosa como soportes

Para determinar el efecto de las condiciones experimentales en la inmovilización de enzimas sobre los soportes CNBr y OC agarosa, se seleccionaron las lipasas de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) con una concentración de proteína de 36 mg/mL y *Pseudomonas cepacea* (PCL) (polvo liofilizado, conteniendo 90% de proteína).

La inmovilización de las lipasas sobre CNBr-agarosa se realizó en presencia de bajas concentraciones de detergente, para obtener la forma monomérica de las lipasas (Palomo y col., 2003 y 2005), a pH 7 y 4 °C. Bajo estas condiciones, las enzimas fueron inmovilizadas a través de la unión covalente uni-puntual entre el grupo amino más reactivo de la proteína (posiblemente el amino terminal) y el soporte.

La **figura 12**, muestra el curso de inmovilización de TLL y PCL sobre el soporte CNBr-agarosa a diferentes concentraciones de buffer fosfato de sodio. Transcurridos 60 minutos, los biocatalizadores obtenidos presentaron un rendimiento de inmovilización de alrededor del 90% de acuerdo con las actividades enzimáticas en la suspensión y el sobrenadante (como se ha descrito previamente en otros ejemplos usando este soporte) (Fernández-Lorente y col., 2003). Además, se observó que la velocidad de inmovilización de las lipasas sobre este soporte es independiente de la fuerza iónica usada, ocasionado por la interacción covalente enzima-soporte.

Figura 12. Cinéticas de inmovilización de PCL (A) y TLL (B) sobre CNBr-agarosa a diferentes concentraciones de buffer. Los experimentos se llevaron a cabo como se describió previamente, usando 0.01% de Tritón X-100 para PCL y CTAB para TLL. Línea sólida: sobrenadantes en fosfato de sodio 25 mM, Línea discontinua: sobrenadantes en fosfato de sodio 500 mM.

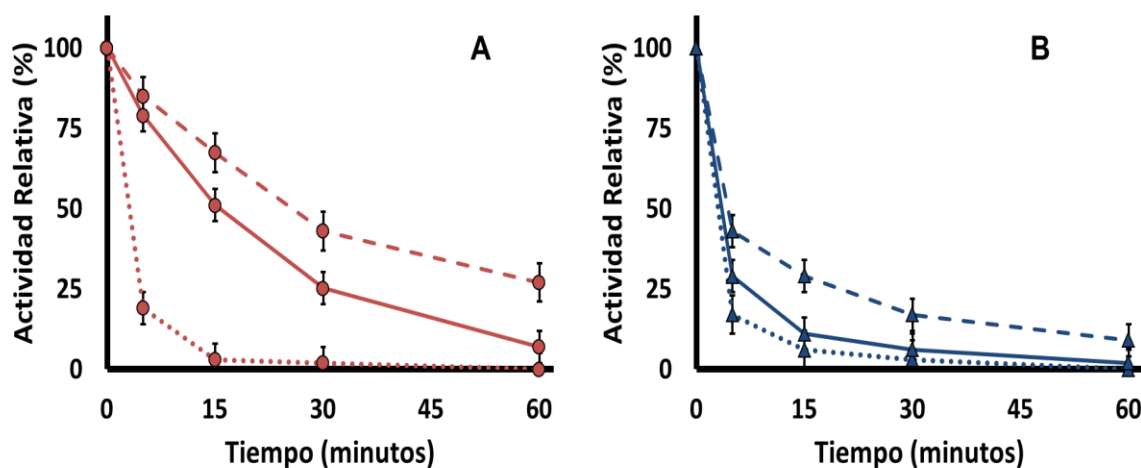


La adsorción de lipasas sobre soportes hidrofóbicos a baja fuerza iónica constituye un método eficiente y rápido para la purificación, inmovilización e hiperactivación de este tipo de enzimas en una sola etapa (Bastida et al., 1998). La inmovilización de la TLL y PCL se realizó a través de la adsorción de las enzimas sobre geles de octil-agarosa a concentraciones crecientes de fuerza iónica (**figura 13**).

Las cinéticas de inmovilización de la TLL y PCL en buffer fosfato de sodio a pH 7 sobre el soporte octil-agarosa (OC) se presentan en la **figura 13**. En una inmovilización estándar, mediante adsorción hidrofóbica, la velocidad de adsorción es directamente proporcional a la fuerza iónica (Bastida et al., 1998); en este caso, se observa un comportamiento opuesto, en el cual la velocidad de inmovilización,

para las dos enzimas, disminuye a medida que la fuerza iónica incrementa. Este resultado concuerda con la hipótesis de que las lipasas son activadas interfacialmente sobre soportes hidrofóbicos, y se explica por el hecho de que la lipasa ha desplazado el equilibrio conformacional, fijando su forma abierta sobre la estructura hidrofóbica (Bastida et al., 1998).

Figura 13. Cinéticas de inmovilización de PCL (A) y TLL (B) sobre Octil-agarosa a diferentes concentraciones de buffer. Los experimentos se llevaron a cabo como se describió previamente, usando 0.01% de Tritón X-100 para PCL y CTAB para TLL. Línea punteada: sobrenadantes en fosfato de sodio 10 mM, Línea sólida: sobrenadantes en fosfato de sodio 100 mM, Línea discontinua: sobrenadantes en fosfato de sodio 1 M.



En consecuencia, si la inmovilización sobre OC se realiza mediante una adsorción de “afinidad de superficie” que involucra la forma abierta de una lipasa, la fuerza iónica tendrá dos efectos negativos sobre la velocidad de inmovilización. Primero, el equilibrio abierto/cerrado se debe desplazar hacia la forma cerrada a alta fuerza iónica, dejando menos expuestas las moléculas de lipasa capaces de activarse interfacialmente frente a la superficie del soporte. Segundo, los dímeros

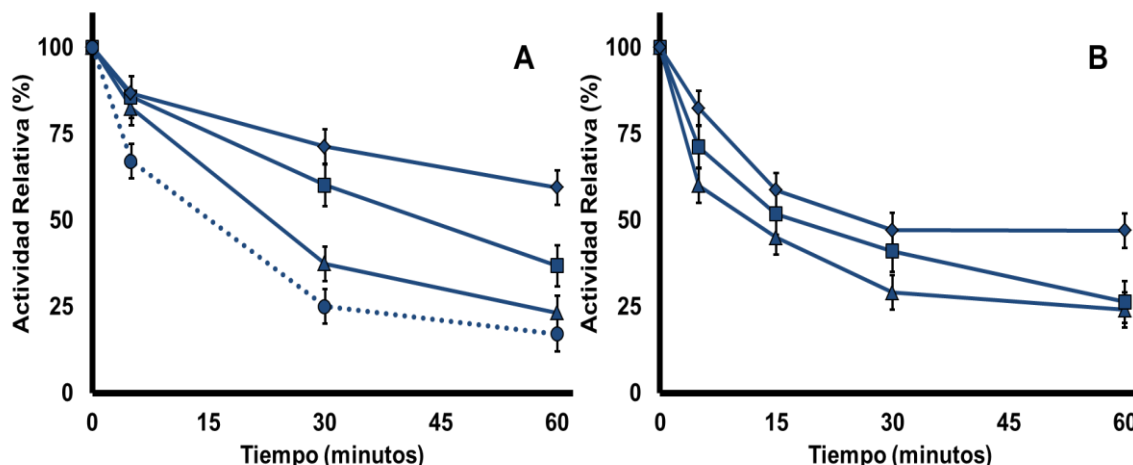
lipasa/lipasa se estabilizan a alta fuerza iónica (Fernández-Lorente y col., 2003; Palomo y col., 2003, 2004 y 2005); por lo cual, se debe establecer un protocolo de inmovilización que permita estabilizar únicamente la conformación abierta de la lipasa sobre el soporte OC.

2.5.2 Inhibición irreversible de las lipasas inmovilizadas sobre los soportes OC y CNBr agarosa

El dietil-p-nitrofenilfosfato (D-pNPP) es un compuesto organofosforado que reacciona de forma específica e irreversible con el sitio activo de la lipasa, debido a la fosforilación de la serina catalítica (Raushel, 2002). En la **figura 14** y **15** se muestran las cinéticas de inhibición de los catalizadores de TLL y PCL inmovilizados sobre Octil o CNBr agarosa mediante la acción del D-pNPP bajo diferentes condiciones, y en la **tabla 3** los tiempos de vida media de la inhibición irreversible de los derivados.

En general, la cinética de inhibición de los derivados de TLL y PCL (**figura 14** y **15**, respectivamente) muestra que las lipasas inmovilizadas covalentemente sobre el soporte CNBr son inhibidas más lentamente que las lipasas inmovilizadas sobre el soporte Octil (incluso a baja fuerza iónica), sugiriendo que las enzimas sobre el soporte hidrofóbico tienen una mayor exposición de la serina catalítica y que el incremento en la fuerza iónica tiene un mayor efecto sobre la velocidad de inactivación de los derivados CNBr que sobre las preparaciones OC.

Figura 14. Cinéticas de inhibición de TLL inmovilizada sobre CNBr (A) u Octil (B) agarosa mediante D-pNPP en diferentes concentraciones de buffer. Los experimentos se llevaron a cabo como se describió previamente. Triángulos: 10 mM de fosfato de sodio; cuadrados: 100 mM de fosfato de sodio; rombos: 1 M de fosfato de sodio; círculos (línea punteada): 10 mM de fosfato de sodio con 0.01% de CTAB.

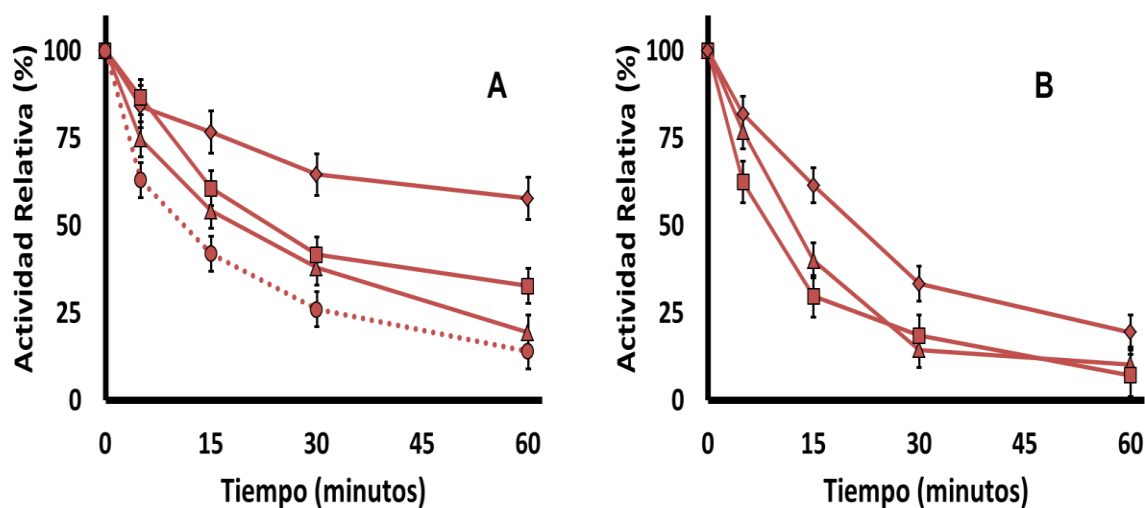


Teniendo en cuenta los tiempos de vida media sobre las cinéticas de inhibición (**tabla 3**), se puede observar que la presencia de 0.01% de detergente (condición donde el equilibrio conformacional de la lipasa se encuentra desplazado hacia la forma abierta), produjo un incremento significativo en la velocidad de inhibición de CNBr comparado con el mismo derivado en ausencia de detergente, manteniendo las condiciones de fuerza iónica (10 mM), lo cual indica que la velocidad de inhibición está directamente relacionada con el grado de exposición de la serina catalítica y por lo tanto, que tan desplazado se encuentra el equilibrio de la lipasa hacia la conformación abierta (Hermoso y col., 1996; Fernández-Lorente y col., 2006; Mogensen y col., 2005; Helisto y col., Jutila y col., 2000; Carrasco-López y col., 2009).

Tabla 3. Tiempos de vida media (en minutos) de los derivados de PCL y TLL inmovilizados sobre CNBr y OC inhibidos irreversiblemente mediante D-pNPP.

Buffer fosfato de sodio	DERIVADO			
	OCTLL	CNBrTLL	OCPCl	CNBrPCL
1 M	20 ± 1.3	70 ± 3.5	19 ± 0.9	68 ± 3.4
100 mM	13 ± 0.8	48 ± 2.4	7 ± 0.4	24 ± 1.2
10 mM	9 ± 0.4	23 ± 1.2	9 ± 0.5	21 ± 1.1
10 mM + detergente	-	13 ± 0.7	-	10 ± 0.5

Figura 15. Cinéticas de inhibición de PCL inmovilizada sobre CNBr (A) u Octil (B) agarosa mediante D-pNPP en diferentes concentraciones de buffer. Los experimentos se llevaron a cabo como se describió previamente. Triángulos: 10 mM de fosfato de sodio; cuadrados: 100 mM de fosfato de sodio; rombos: 1 M de fosfato de sodio; círculos (línea punteada): 10 mM de fosfato de sodio con 0.01% de Tritón.



En consecuencia, en el soporte OC se inmoviliza y estabiliza la forma abierta de la lipasa (favoreciendo una rápida inhibición de la enzima); mientras que en el soporte CNBr se mantiene el equilibrio de las formas abierta/cerrada de la enzima.

El incremento de la fuerza iónica durante la inhibición desplaza el equilibrio conformacional de la lipasa hacia su forma cerrada, haciendo que la enzima sea más resistente a la inhibición cuando es inmovilizada sobre CNBr (2.6 y 3.6 veces más para TLL y PCL, respectivamente). Por otro lado, el efecto de la fuerza iónica sobre la velocidad de inhibición de las enzimas inmovilizadas sobre el soporte OC no es significativo; lo cual está relacionado con el hecho de que las lipasas (inmovilizadas sobre el soporte OC) mantienen su forma abierta, incluso en condiciones de alta fuerza iónica; además, el bajo efecto puede estar relacionado con la interacción de la enzima con el soporte, que puede ser más fuerte a alta fuerza iónica, acortando las distancias de unión enzima-soporte, ocasionando algunas limitaciones difusionales en la entrada del inhibidor al sitio activo de la enzima.

2.5.3 Estudio del efecto de las condiciones experimentales sobre la actividad hidrolítica del mandelato de metilo

Considerando la actividad de las preparaciones de TLL y PCL frente a p-NPB, los derivados de Octil agarosa presentaron una mayor actividad que los derivados covalentes. Las actividades fueron de 23 U/mg para OCTLL y 20 U/mg para OCPCL, mientras que las actividades para los derivados covalentes fueron de 4 U/mg para CNBrTLL y 12 U/mg para CNBrPCL. Estos resultados son comparables con los obtenidos previamente en la inhibición irreversible mediante D-pNPP, donde la velocidad de inactivación está relacionada con el grado de exposición del sitio activo (Ser catalítica).

La actividad frente a un sustrato específico es algo más complicado que la simple existencia de una forma más abierta o cerrada de la lipasa. La conformación molecular global de la enzima puede jugar un rol importante (adsorción del sustrato, desempeño catalítico) y cualquier cambio en el medio de reacción puede afectar su rendimiento. En efecto, algunas preparaciones inmovilizadas de las lipasas tienen una actividad muy baja frente a un sustrato y una actividad muy alta frente a otros, lo cual no puede ser derivado del equilibrio conformacional, el cual debería ser similar en todos los casos (ej. lipasas inmovilizadas sobre divinilbenceno; García-Galan y col., 2014). Además, la fuerza iónica o la presencia de detergentes puede generar efectos negativos sobre la forma abierta del CNBr-derivado, e incluso cambios conformacionales que pueden afectar las propiedades de la enzima (Jutila y col., 2000).

Por lo anterior, la actividad de las preparaciones covalentes de TLL y PCL fue analizada en la hidrólisis de mandelato de metilo a 25 o 500 mM de buffer fosfato de sodio a pH 7. El sustrato siempre fue soluble bajo estas condiciones, así el efecto de la concentración del sustrato puede ser descartado. Los dos sustratos usados en este estudio son estructuralmente diferentes (**Figura 16**), obteniéndose en su hidrólisis un ácido lineal (ácido butírico) en el caso del p-NPB y un ácido aromático (ácido mandélico) en el caso del mandelato de metilo.

Figura 16. Hidrólisis de mandelato de metilo y de p-NPB.

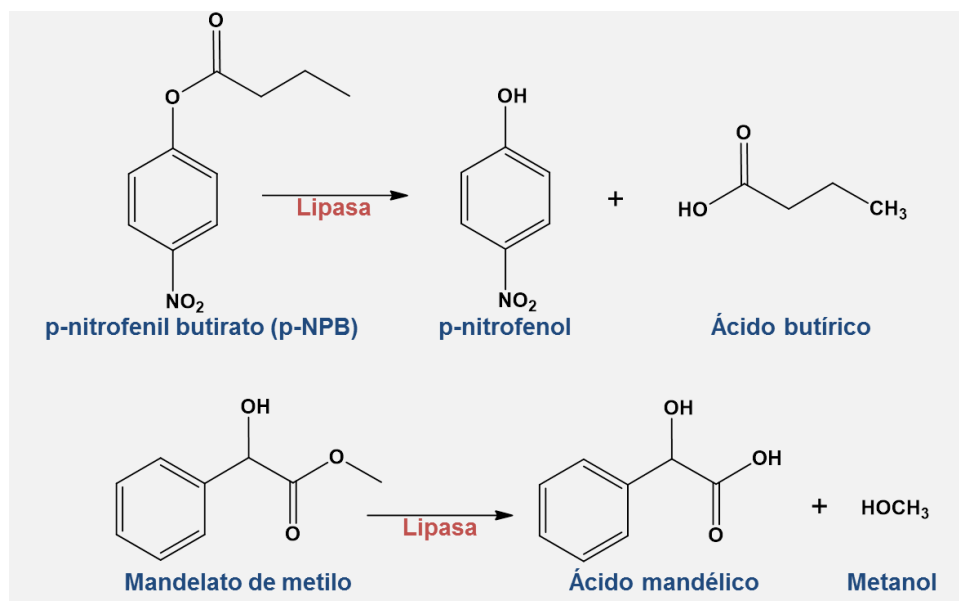


Tabla 4. Actividad de las diferentes preparaciones de PCL y TLL frente al mandelato de metilo a pH 7 y diferentes condiciones.

Biocatalizador / Condiciones	Actividades (U / mg_{enzima})
OCTL / pH 7, 25 mM	106.6 ± 5.0
OCTL / pH 7, 500 mM	93.7 ± 3.0
CNBrTLL / pH 7, 25 mM	85.4 ± 2.0
CNBrTLL / pH 7, 500 mM	36.3 ± 1.5
OCPCL / pH 7, 25 mM	56.6 ± 2.5
OCPCL / pH 7, 500 mM	55.7 ± 2.0
CNBrPCL / pH 7, 25 mM	56.1 ± 3.0
CNBrPCL / pH 7, 500 mM	20.6 ± 2.0

A una concentración de buffer 25 mM, el derivado OCTLL presenta 20% más de actividad que el derivado CNBrTLL, mientras que las dos preparaciones de PCL tienen actividades casi idénticas (**Tabla 4**). Esto ocurre aunque la inactivación de la enzima en presencia del inhibidor D-pNPP es mucho más rápida para los derivados Octil en los dos casos, confirmando que la actividad catalítica no puede ser explicada solamente por la exposición de la Serina catalítica al medio.

Cuando se utilizó buffer de fosfato de sodio 500 mM (usando NaCl o sulfato de amonio los resultados fueron cualitativamente similares), las lipasas inmovilizadas mediante unión covalente unipuntual sufren una disminución drástica en su actividad, del 42% para TLL y 36% para PCL. Las preparaciones de Octil de las dos enzimas conservaron su actividad casi inalterada; este resultado concuerda con la baja sensibilidad de estas preparaciones a las condiciones del medio (mostrados previamente, sección 2.5.2), debido a que el equilibrio está desplazado hacia la forma abierta de la lipasa (estabilizada) e incluso sugiere que el biocatalizador inmovilizado sobre Octil no posee ninguna molécula de enzima en su conformación cerrada. Además, las dos lipasas son resistentes a cambios conformacionales inducidos por variaciones en la fuerza iónica.

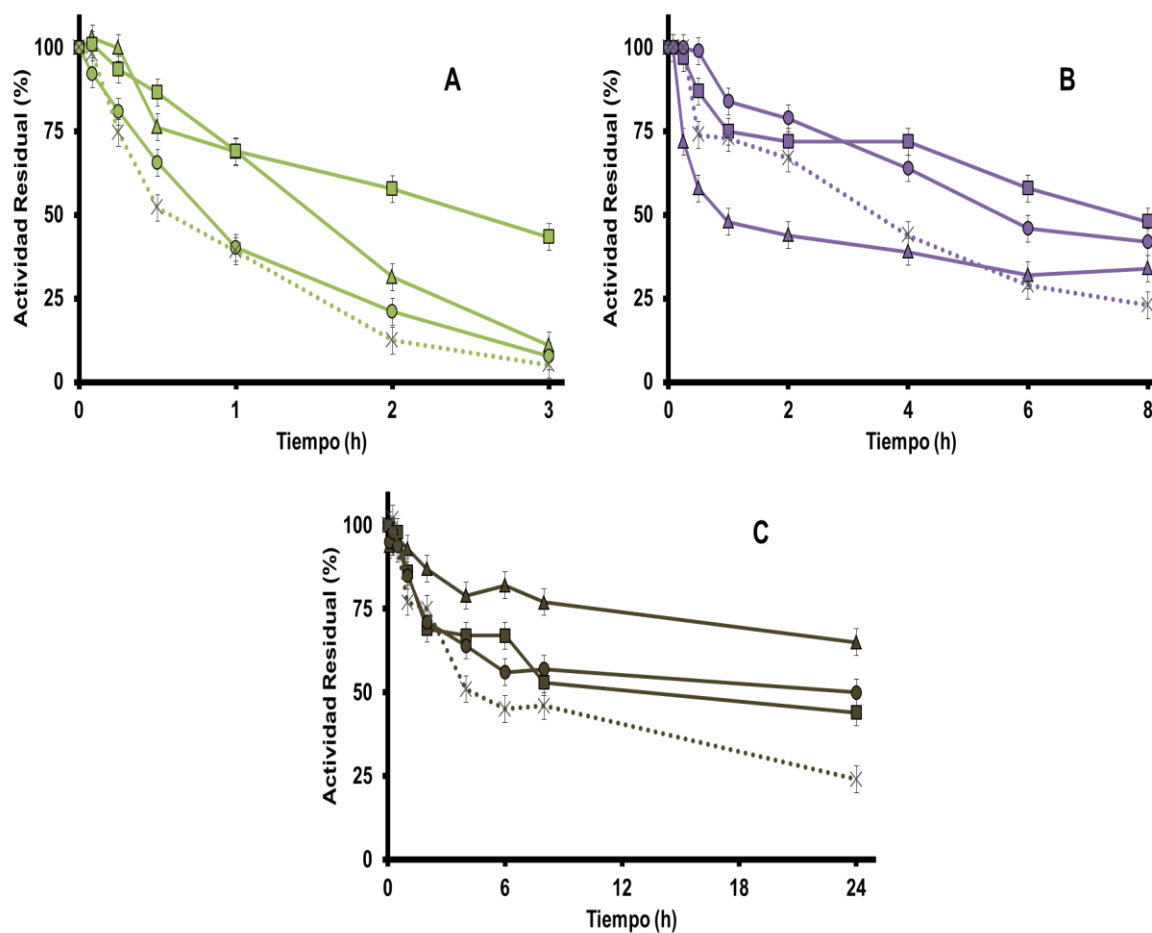
2.5.4 Efecto de las sales de cloro sobre la estabilidad de los diferentes derivados

Se evaluó el efecto de diferentes cationes (las sales en medio acuoso se disocian en cationes y aniones) provenientes de sales cloradas, sobre la estabilidad de derivados lipásicos OC y CNBr. Los biocatalizadores de CALA, CRL, RML, TLL y Lecitasa fueron preparados como se describió en la sección 2.3.1.

Algunas enzimas libres y diferentes preparaciones inmovilizadas de lipasas fueron inactivadas a temperaturas comprendidas entre 45 y 80 °C a pH 7 en presencia de sales de cloro (CaCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2). En la **figura 17**, se observa que la

estabilidad de los derivados OC de TLL, CALA y Lecitasa, en presencia de los cationes divalentes (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}) generados por la disociación de cada una de las sales en medio acuoso, se ve afectada para cada enzima por una sal diferente. A diferencia de lo observado para las lipasas de RML y CRL inmovilizadas sobre OC, cuya estabilidad se ve afectada en presencia de las sales de Mn y Ca (**Figura 18 y 19**). Por lo cual, el estudio se centró en el efecto de las sales sobre los derivados de RML y CRL.

Figura 17. Estabilidad de diferentes biocatalizadores en presencia de diferentes sales de cloro 5 mM preparadas en Tris HCl 5 mM a pH 7. Panel A: OCTLL incubada a 73°C, Panel B: OC-Lecitasa incubada a 45°C y Panel C: OCCALA incubada a 80°C. Línea punteada (referencia): sin cationes, Triángulos: CaCl_2 , cuadrados: MgCl_2 , círculos: MnCl_2 .

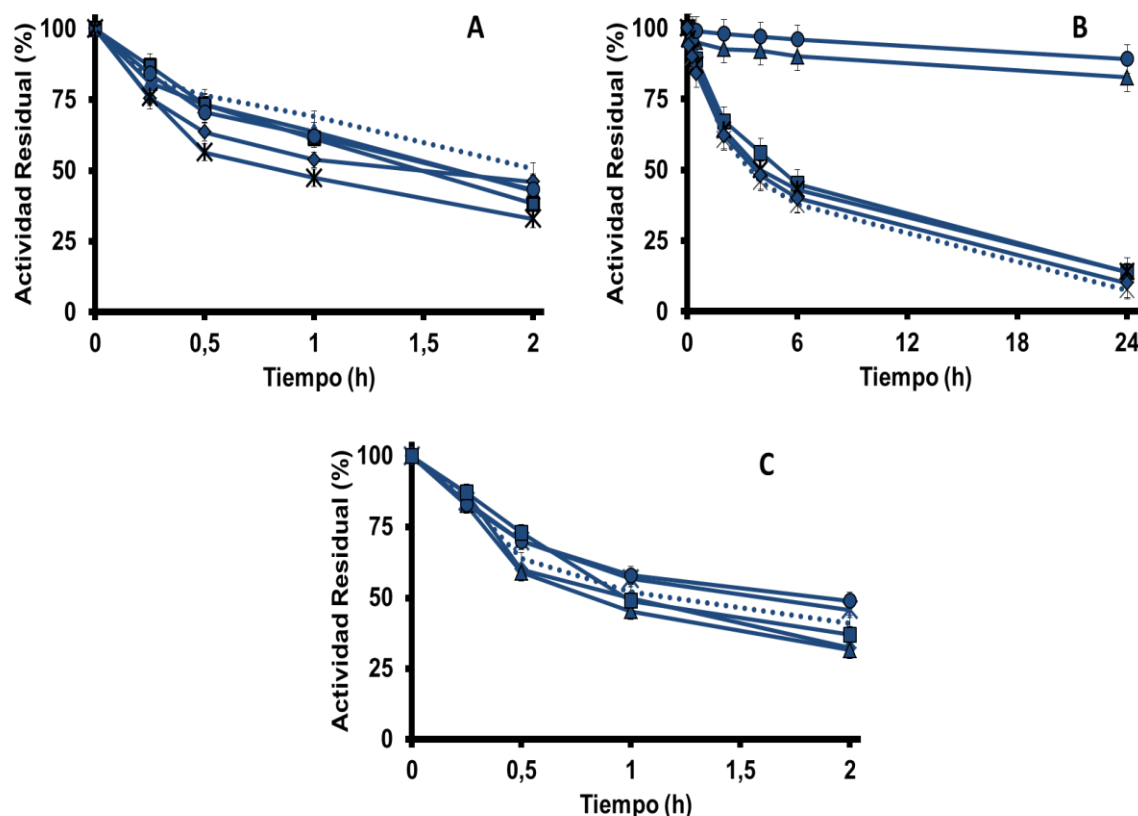


En general, a partir de los resultados obtenidos con RML y CRL (**Figura 18 y 19**, respectivamente) se demostró que las lipasas en solución (enzimas libres) y las inmovilizadas sobre CNBr, no fueron estabilizadas en presencia de sales (de hecho la inactivación fue ligeramente más rápida en presencia de cationes usando RML y ligeramente más lenta con CRL). Por otro lado, el efecto de estabilización

resultó muy relevante en el caso en el que se evaluaron las preparaciones de OC en presencia de las sales de Mn^{2+} o Ca^{2+} (5 mM).

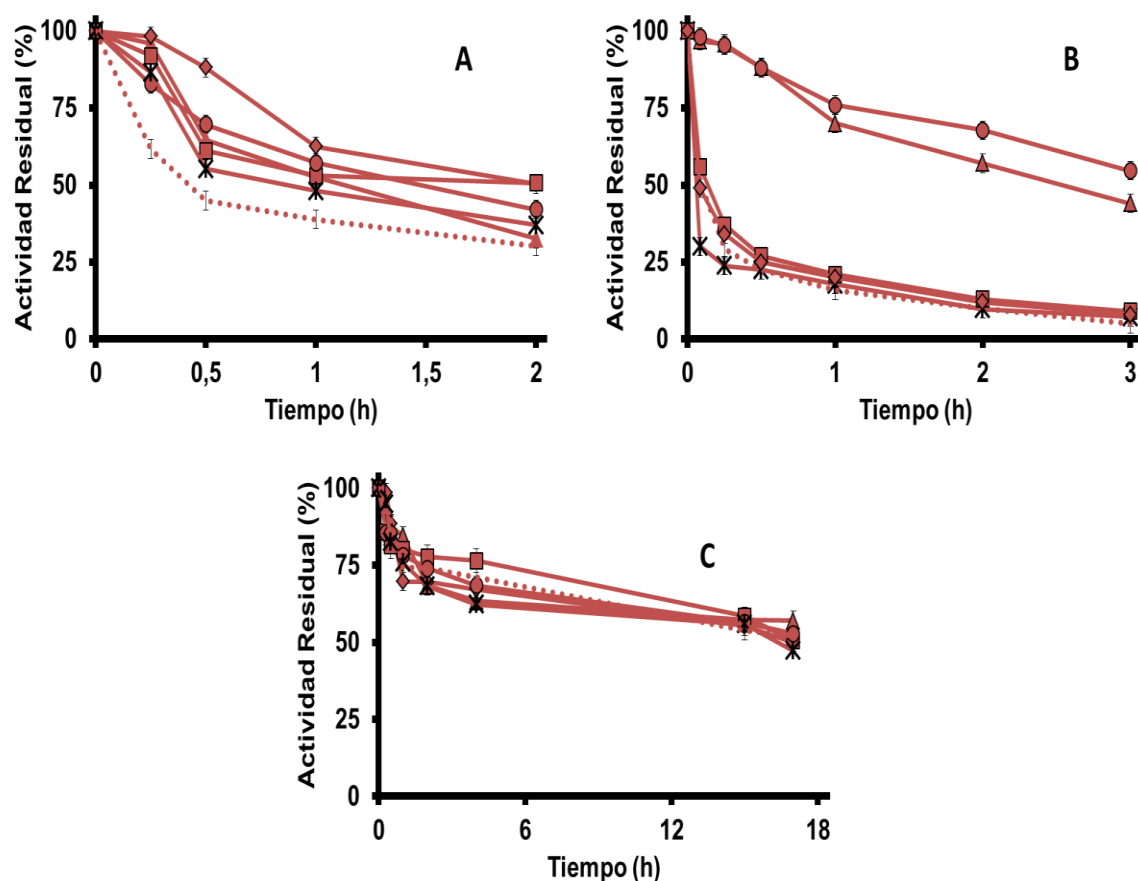
En la **figura 18**, se observó un incremento en la estabilidad de OCRML en presencia de CaCl_2 y MnCl_2 (Ca^{2+} y Mn^{2+}) comparado con los resultados obtenidos al utilizar el derivado enzimático en ausencia de sales. En este último caso, se retuvo más del 90% de la actividad inicial. La estabilidad obtenida en presencia de los dos cationes fue similar, ya que en presencia de Mn^{2+} la vida media de OCRML mejoró alrededor de 50 veces y de 40 veces con Ca^{2+} .

Figura 18. Estabilidad de diferentes biocatalizadores de RML en presencia de diferentes sales de cloro 5 mM preparadas en Tris HCl 5 mM a pH 7. Las preparaciones fueron incubadas a las temperaturas indicadas. Panel A: Enzima soluble 45°C, Panel B: OC-RML 45°C y Panel C: CNBr-RML 50°C. Línea punteada (referencia): sin cationes, estrellas: NaCl, rombos: KCl, triángulos: CaCl_2 , cuadrados: MgCl_2 , círculos: MnCl_2 .



En el caso de OCCRL la estabilización fue de 30 veces en presencia de Mn^{2+} y de 25 veces con Ca^{2+} en relación con el mismo derivado sin cationes presentes (**figura 19**). En cualquier caso, la estabilización permitió un salto cualitativo: la enzima en presencia de cationes retiene alrededor del 80% de la actividad inicial mientras que la referencia (el derivado en ausencia de sales) presentó menos del 20% de actividad.

Figura 19. Estabilidad de diferentes biocatalizadores de CRL en presencia de diferentes sales de cloro 5 mM preparadas en Tris HCl 5 mM a pH 7. Las preparaciones fueron incubadas a las temperaturas indicadas. Panel A: Enzima soluble 50°C, Panel B: OC-CRL 60°C y Panel C: CNBr-CRL 55°C. Línea punteada (referencia): sin cationes, estrellas: NaCl, rombos: KCl, triángulos: CaCl₂, cuadrados: MgCl₂, círculos: MnCl₂.



En el caso de las dos enzimas libres de RML y CRL, la presencia de sales no generó ningún efecto sobre la estabilidad, quizás este resultado se debió a la agregación de moléculas de RML y CRL en presencia de estos cationes. Por lo

anterior, las enzimas RML y CRL fueron inmovilizadas covalentemente sobre CNBr, ya que luego de la inmovilización, la agregación de moléculas enzimáticas no es posible y el efecto de los cationes será reflejado directamente sobre la estabilidad de la enzima.

Sobre las preparaciones enzimáticas inmovilizadas mediante unión covalente unipuntual, CNBrRML (**figura 18**) o CNBrCRL (**figura 19**), no se observó un aumento en la estabilidad en presencia de estos cationes, ya que estos resultados fueron similares a los obtenidos con el derivado enzimático en ausencia de sales. La inhibición de las enzimas libres mediante D-pNPP también fue similar en presencia o ausencia de estas sales, sugiriendo que el porcentaje de moléculas de lipasa en su forma abierta-cerrada permanecieron inalteradas. En consecuencia, el efecto estabilizante de las sales observado en los derivados OC de RML y CRL, no se generó sobre la estabilidad de la enzima libre, probablemente porque las sales promueven la agregación de la enzima y ello puede solapar el efecto estabilizante de los cationes.

Los resultados sugieren que el efecto estabilizante en presencia de los cationes por Mn^{2+} o Ca^{2+} , sólo se presenta en los derivados preparados mediante adsorción sobre el soporte hidrofóbico Octil-agarosa (que estabiliza únicamente la conformación abierta de las lipasas), mientras que las enzimas no-adsorbidas (enzima libre e inmovilizada sobre CNBr) no son estabilizadas, ya que se encuentran en un equilibrio entre la conformación abierta y cerrada de las lipasas (Derewenda y col., 1992; Verguer, 1997).

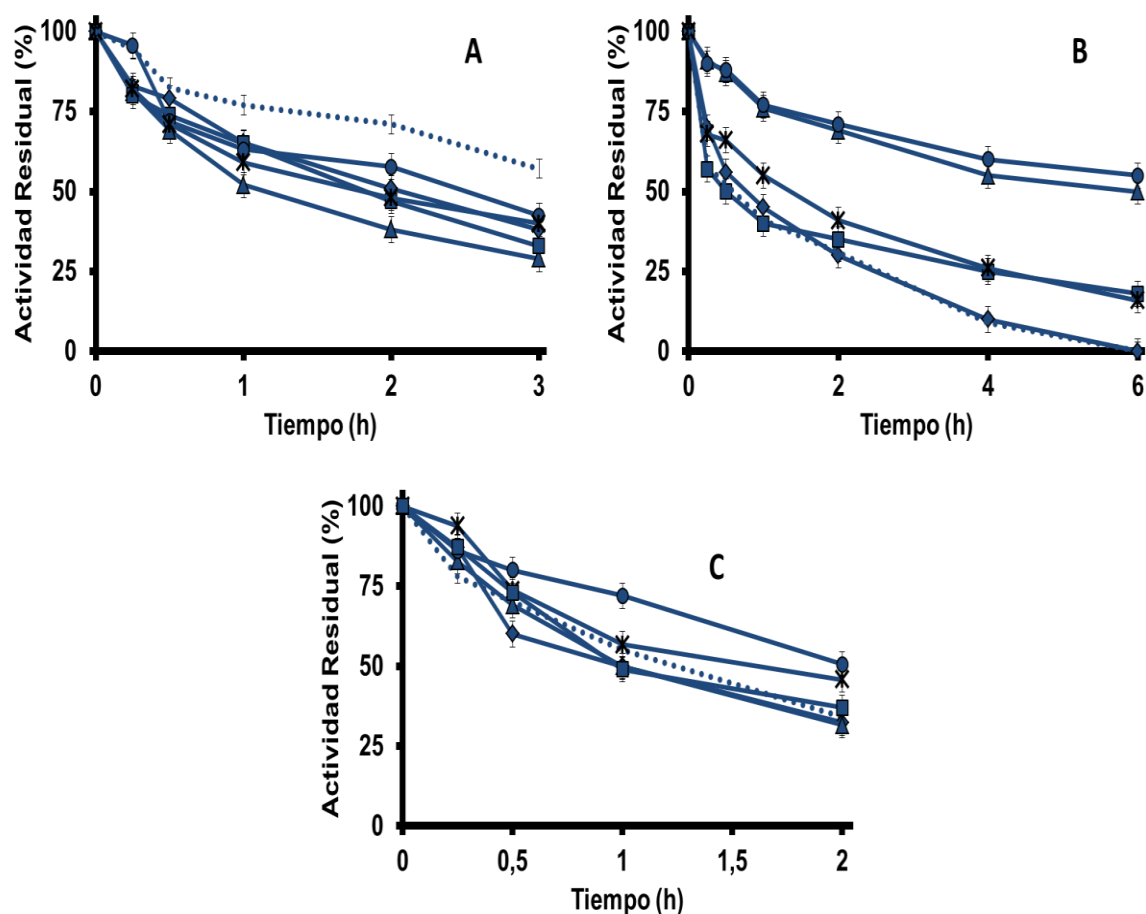
La estabilización mediante Mn^{2+} fue ligeramente mayor que cuando se utilizó Ca^{2+} tanto para RML como para CRL. La falta de efecto sobre la estabilidad de las enzimas en presencia de Mg^{2+} , sugiere que la estabilización de la lipasa producida por efecto de iones Mn^{2+} o Ca^{2+} en el medio de reacción, podría seguir un

mecanismo específico, que quizás involucra la adsorción de estos cationes sobre lugares específicos de la superficie enzimática.

El efecto de estabilización de los cationes sobre los biocatalizadores preparados de RML y CRL fue evaluado a pH 5, con el fin de determinar si estos resultados se pueden presentar en otras condiciones de la reacción enzimática. La **figura 20** y **21** muestran que los resultados obtenidos a pH 5 son similares a los encontrados a pH 7 (figura 18 y 19). La velocidad de inactivación de la RML (**figura 20**) libre fue acelerada de forma más clara a pH 5 que a pH 7 por la presencia de todos los cationes, mientras que la estabilidad de la CRL libre permanece casi inalterada (**figura 21**).

El derivado CNBrRML, está ligeramente estabilizado por efecto de Mn^{2+} en el medio de reacción (por un factor menor que 2) (**figura 20**), mientras que la estabilidad de CNBrCRL no se vio influenciada por la presencia de cationes (**figura 21**).

Figura 20. Estabilidad de diferentes preparaciones de RML en presencia de diferentes sales de cloro 5 mM preparadas en acetato de sodio 5 mM a pH 5. Las preparaciones fueron incubadas a las temperaturas indicadas. Panel A: Enzima soluble 45°C, Panel B: OCRML 50°C y Panel C: CNBrRML 65°C. Línea punteada (referencia): sin cationes, estrellas: NaCl, rombos: KCl, triángulos: CaCl_2 , cuadrados: MgCl_2 , círculos: MnCl_2 .

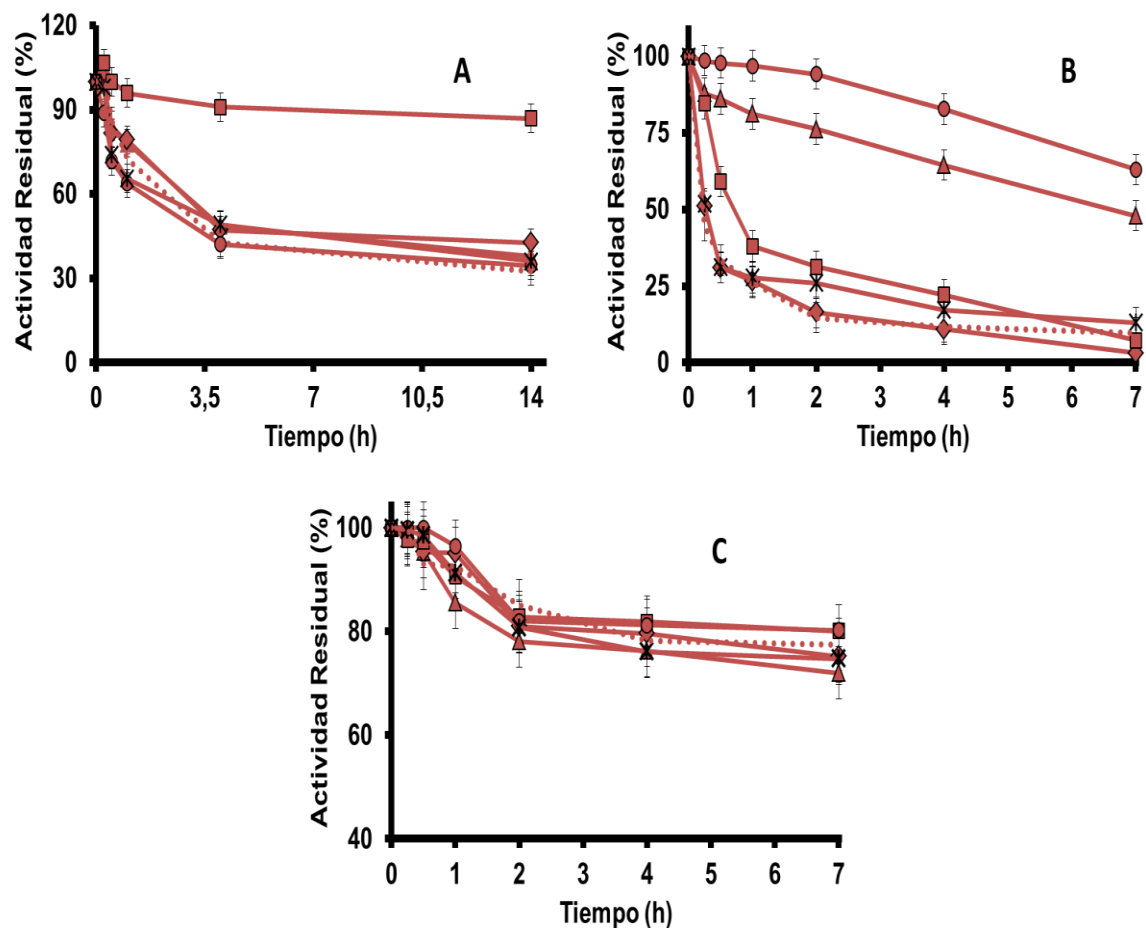


Una vez más, se observa una clara estabilización usando Mn^{2+} o Ca^{2+} en las preparaciones de OC. La estabilización fue más baja que la obtenida a pH 7, en el caso de OCRML, de 20 veces usando Ca^{2+} y de 25 veces con Mn^{2+} , mientras que con CRL la estabilización parece muy similar (28 veces con Ca^{2+} y 32 con Mn^{2+}).

En valores alcalinos de pH, tanto Mn^{2+} como Ca^{2+} presentaron una solubilidad reducida; por tanto este estudio se enfocó en valores neutros y ácidos de pH.

Figura 21. Estabilidad de diferentes preparaciones de CRL en presencia de diferentes sales de cloro 5 mM preparadas en acetato de sodio 5 mM a pH 5.

Las preparaciones fueron incubadas a las temperaturas indicadas. Panel A: Enzima soluble 50°C, Panel B: OCCRL 58°C y Panel C: CNBrCRL 60°C. Línea punteada (referencia): sin cationes, estrellas: NaCl, rombos: KCl, triángulos: $CaCl_2$, cuadrados: $MgCl_2$, círculos: $MnCl_2$.



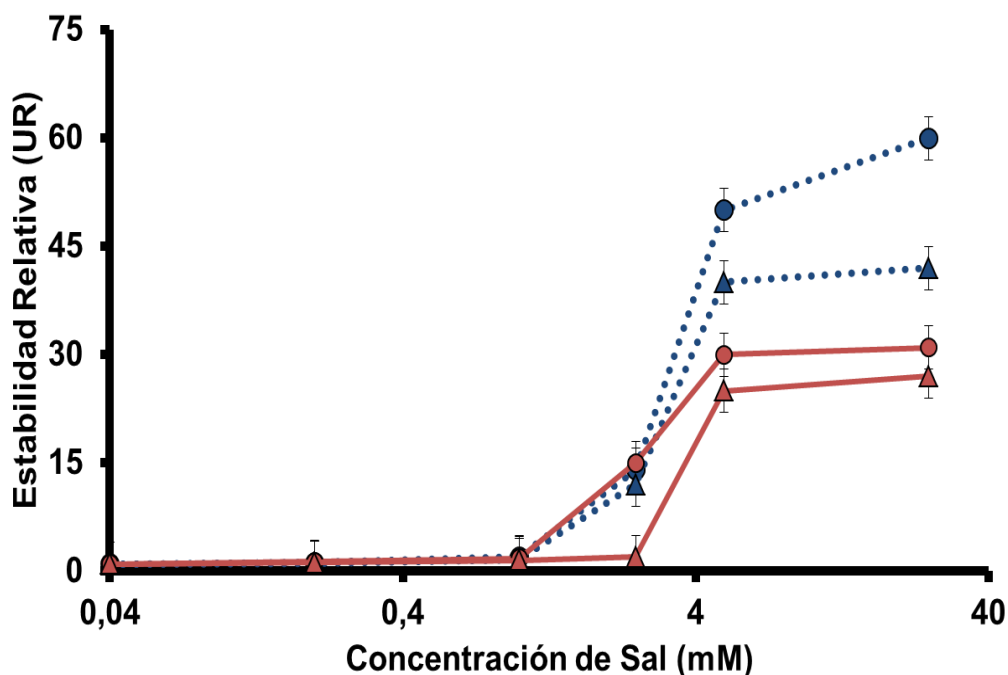
El uso de estas sales en concentraciones de 5 mM, durante los ensayos de actividad, no produjo ningún efecto relevante en la actividad de los diferentes biocatalizadores. Por tanto, el efecto principal de los cationes se obtuvo sobre el mejoramiento de la estabilidad de los derivados Octil.

2.5.5 Efecto de la concentración de MnCl_2 o CaCl_2 sobre la estabilidad de los diferentes derivados

El efecto de los dos cationes respecto a su concentración fue estudiado sobre los biocatalizadores de RML y CRL; la concentración de las sales usada varió en un rango desde 0 hasta 25 mM (un aumento adicional de la concentración de los cationes no tuvo efecto sobre la estabilidad de los derivados) a pH 7. La **figura 22** muestra que a concentraciones de sal menores o iguales a 1 mM, el efecto de estabilización no fue significativo; además, la estabilización a 2.5 mM fue de 10 a 15 veces mayor en comparación con el derivado en ausencia de sales. Sin embargo, cuando se utilizó 2.5 mM de Ca^{2+} en OCRML, no se presentó el mismo efecto de estabilización.

El incremento en la concentración de los cationes a 5 mM permitió aumentar el efecto sobre la estabilidad de los derivados de RML y CRL; mientras que el efecto estabilizante de los dos cationes, al incrementar la concentración a 25 mM, no fue significativo sobre los derivados. La mayor estabilización fue obtenida al aumentar la concentración de Mn^{2+} de 5 mM a 25 mM en el medio de reacción del derivado OCRML; en este caso, el incremento en el factor de estabilización fue de 50 a 60, lo cual sugiere, que el catión debe saturar el lugar o lugares de estabilización de la enzima.

Figura 22. Efecto de la concentración de Mn^{2+} o Ca^{2+} sobre la estabilidad de OCRML y OCCRL. La inactivación se llevó a cabo en TrisHCl 5 mM a pH 7 y a las temperaturas indicadas. Línea punteada: OCRML a 45°C, línea sólida: OCCRL a 60°C. Triángulos: $CaCl_2$, círculos: $MnCl_2$. La unidad de Unidades Relativas (UR) es considerada como la vida media de la preparación OC en TrisHCl sin cationes.



En general, la presencia de cationes de Mn^{2+} o Ca^{2+} en una concentración de 5 mM generó una mayor estabilización de los derivados OCRML y OCCRL; por consiguiente, esta concentración de sal fue usada como referencia en la hidrólisis de mandelato de metilo.

2.5.6 Estudio del efecto de Mn^{2+} o Ca^{2+} en la especificidad de los diferentes derivados de RML y CRL

En muchos casos, se ha reportado que la especificidad de las lipasas puede ser alterada fácilmente por cualquier estrategia que pueda modificar la conformación

final de la enzima, por ejemplo la inmovilización a través de diferentes protocolos (Dos Santos y col., 2014; Garcia-Galan y col., 2014; Barbosa y col., 2012). Previamente se observó, que los cationes no tienen efecto en la actividad catalítica de las lipasas en la hidrólisis de p-NPB. Ahora, la actividad enzimática frente a un sustrato más complejo (de naturaleza quiral) fue analizada. El mandelato de metilo *R* o *S* fue hidrolizado usando OCRML y OCCRL en presencia o ausencia de CaCl₂ o MnCl₂ (5 mM).

En la **tabla 5** se observa que no se presentó efecto significativo sobre las actividades catalíticas de RML y CRL frente a estos sustratos. Lo cual sugiere que el rol estabilizante de estos cationes no involucra cambios conformacionales en los derivados Octil, sino que refuerzan la estructura global de la enzima.

Tabla 5. Efecto de los diferentes cationes sobre la actividad de los derivados Octil-lipasa frente al mandelato de metilo *R* o *S*. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo usando como sustrato *R* o *S* mandelato de metilo (50 mM) a pH 7 y 25°C, como se describió previamente. ^aActividad (x10³).

Biocatalizador (catión)	V_R Mandelato de metilo^a	V_S Mandelato de metilo^a	V_R / V_S
OCRML (ninguno)	6.5 ± 0.32	7.0 ± 0.35	0.93
OCRML (CaCl ₂)	6.8 ± 0.34	6.1 ± 0.31	1.11
OCRML (MnCl ₂)	7.2 ± 0.36	7.1 ± 0.36	1.01
OCCRL (ninguno)	0.5 ± 0.03	1.4 ± 0.07	0.36
OCCRL (CaCl ₂)	0.6 ± 0.03	1.3 ± 0.08	0.46
OCCRL (MnCl ₂)	0.6 ± 0.03	1.4 ± 0.06	0.43

2.6 CONCLUSIONES

Las lipasas son moléculas bastante complejas, que tienen la posibilidad de someterse a grandes cambios conformacionales durante la apertura/cierre de su estructura. La inmovilización sobre el soporte Octil-agarosa no es una adsorción hidrofóbica convencional sino una inmovilización que involucra la conformación abierta de las lipasas. Esta forma abierta es estabilizada luego de la adsorción y su conservación no depende de las condiciones del medio, en oposición con la inmovilización a través de otros protocolos estándar.

Al aumentar la fuerza iónica, en el medio de inmovilización de las lipasas de *Thermomyces lanuginosus* y *Pseudomonas cepacea* sobre el soporte octil-agarosa, la velocidad de inmovilización disminuye pero no altera la conformación abierta de la enzima inmovilizada. Por el contrario, la inmovilización sobre el soporte CNBr es independiente de la fuerza iónica pero el equilibrio conformacional abierto/cerrado depende de las condiciones del medio.

Usar sales que contengan Mn^{2+} o Ca^{2+} podría ser una alternativa para incrementar significativamente la estabilidad de las enzimas en medio acuoso durante el funcionamiento del biocatalizador en un rango de valores de pH de 5 a 7 (a valores alcalinos de pH se presentaron problemas de solubilidad de las sales). Teniendo en cuenta que es importante evaluar la estabilización/desestabilización de un biocatalizador enzimático cada vez que el protocolo de inmovilización es cambiado, ya que los resultados para una preparación enzimática no se pueden extrapolar a otra preparación, lo cual se demostró con este estudio.

3. MEJORAMIENTO DE LA ESTABILIDAD Y ESTRATEGIAS DE REACTIVACIÓN DE LIPASAS INMOVILIZADAS SOBRE EL NUEVO SOPORTE HETEROFUNCIONAL OCTIL-GLIOXIL AGAROSA

3.1 INTRODUCCIÓN

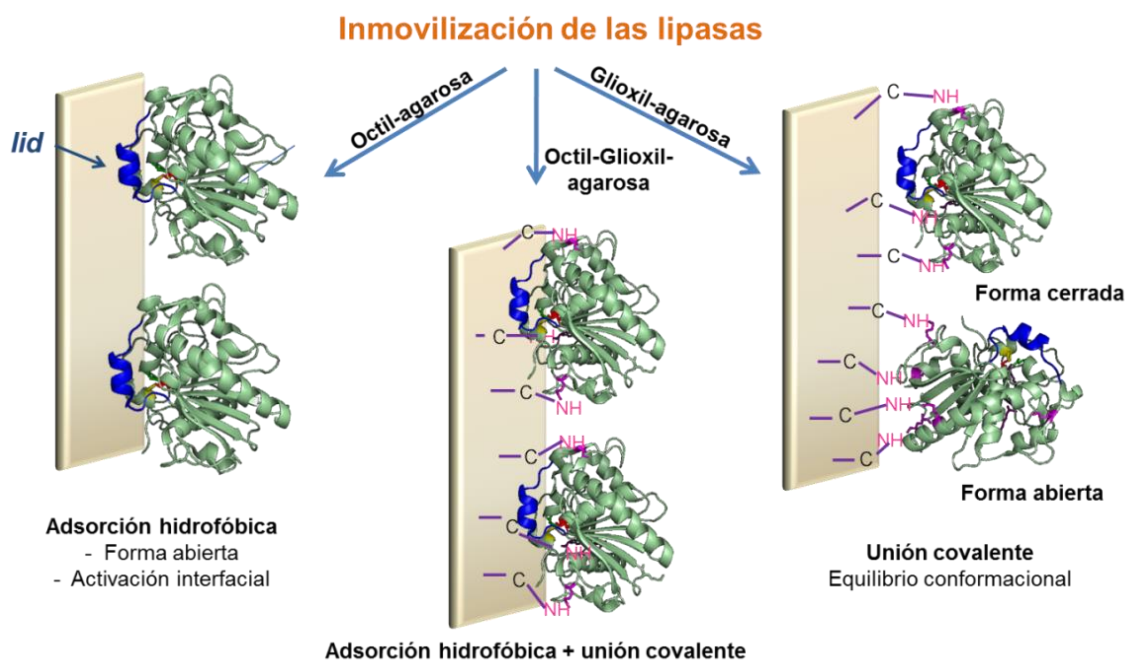
La mayoría de lipasas mantienen un equilibrio entre dos diferentes estructuras conformacionales, una abierta y la otra cerrada, donde el centro activo puede estar aislado del medio mediante una cadena polipeptídica (Derewenda y col., 1992; Uppenberg y col., 1994; Carrasco-López y col., 2009). La forma abierta es inestable en medio acuoso, pero es estabilizada mediante adsorción sobre cualquier interface hidrofóbica, como una proteína hidrofóbica, gotas de aceites, otra lipasa en su forma abierta o un soporte con grupos hidrofóbicos en su superficie (Fernández-Lafuente y col., 1998).

Uno de los soportes hidrofóbicos más empleados para lograr la inmovilización, estabilización, purificación e hiperactivación en una sola etapa de muchas lipasas es el soporte octil-agarosa (Fernandez-Lafuente y col., 1998; Bastida y col., 1998; Barbosa y col., 2012; Fernández-Lorente y col., 2003; Garcia-Galan y col., 2014). A pesar de que la adsorción de la enzima, sobre los grupos hidrofóbicos presentes en el soporte, es fuerte, la lipasa puede ser desorbida si el derivado es incubado en presencia de altas concentraciones de cosolventes orgánicos (usados para solubilizar algunos sustratos o productos) (Fernández-Lorente y col., 2011) o en presencia de detergentes (Bastida y col., 1998; Fernández-Lorente y col., 2007).

En este sentido, se propuso el desarrollo de un nuevo método para usar octil-agarosa en la inmovilización, purificación, estabilización e hiperactivación de lipasas y útil para ser usado en presencia de solventes orgánicos o detergentes; este método está basado en el uso de soportes heterofuncionales, que poseen en

su superficie diferentes grupos funcionales, que pueden permitir el control de la inmovilización de las enzimas (Barbosa y col., 2013). Por lo anterior, se diseñó un nuevo soporte heterofuncional, a partir del soporte comercial octil-agarosa, que posee grupos hidrofóbicos, que hicieron posible la inmovilización de la enzima mediante adsorción, y grupos glioxil, que permitieron la unión covalente enzima-soporte (**figura 23**). Además, se estudió la posibilidad de reactivación de lipasas inmovilizadas sobre el soporte octil-glioxil agarosa y covalentemente inmovilizadas sobre soportes estándar (glioxil o bromo-cianógeno agarosa).

Figura 23. Inmovilización de lipasas sobre diferentes soportes.



3.2 MATERIALES

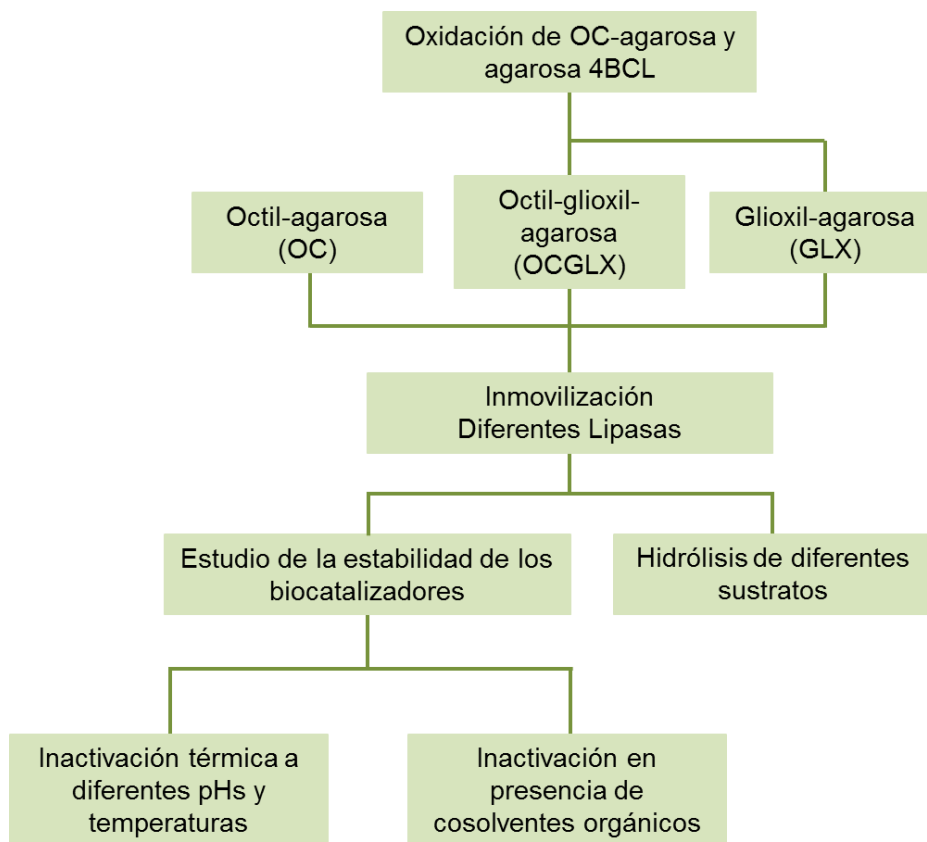
La lipasa B de *Candida antarctica* (CALB), lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), lipasa de *Rhizomucor miehei* (RML) y la fosfolipasa Lecitasa Ultra (LU)

fueron obtenidas de Novozymes (España). El soporte Octil agarosa 4BCL, agarosa 4BCL y Bromo cianógeno-agarosa 4B (CNBr) fueron obtenidos de GE Healthcare. El etil hexanoato, metil mandelato, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), Tritón X-100 y p-nitrofenilbutirato (p-NPB) fueron obtenidos de Sigma Aldrich. Todos los solventes y reactivos utilizados fueron de grado analítico.

3.3 MÉTODOS EXPERIMENTALES

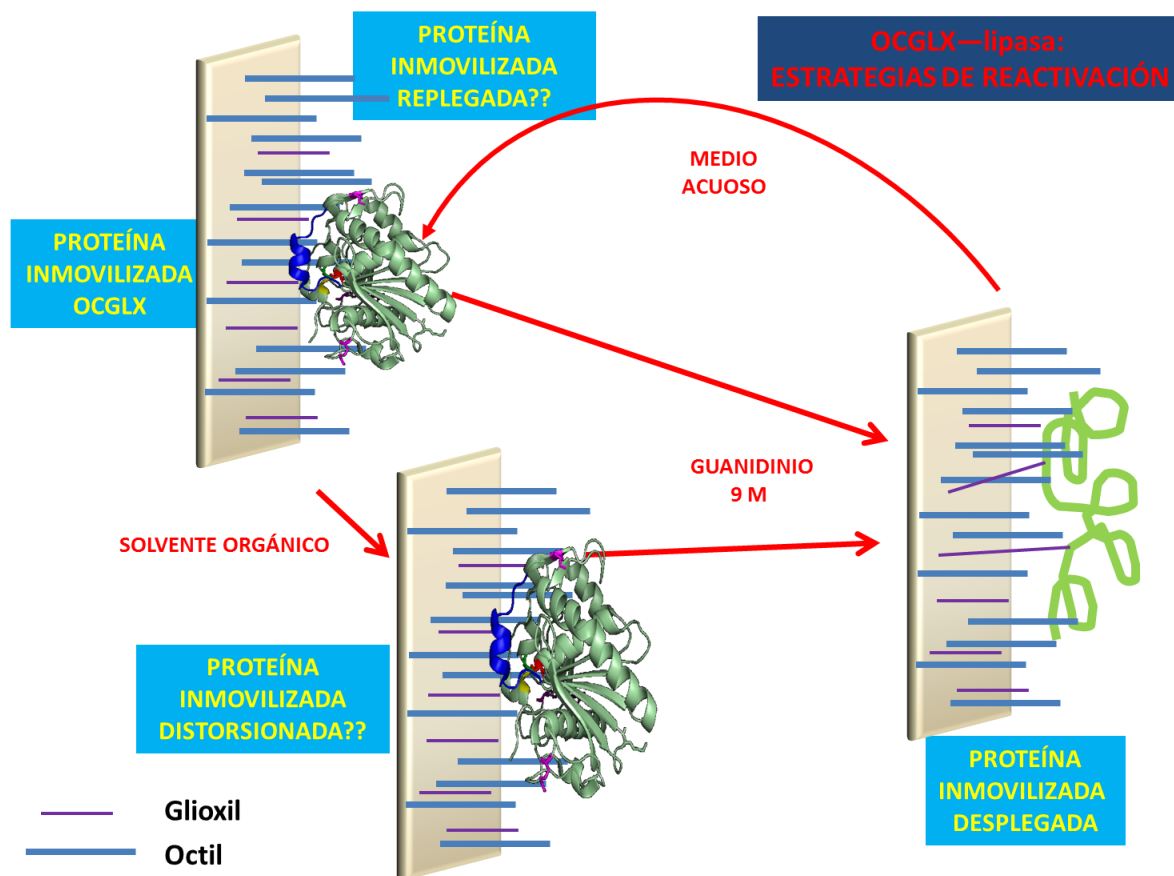
La metodología general propuesta y desarrollada se presenta en la **figura 24**. En primer lugar se llevó a cabo la modificación de los soportes agarosa y octil-agarosa mediante oxidación directa de los grupos dioles presentes. Luego, las lipasas fueron inmovilizadas empleando tres estrategias: i) adsorción interfacial sobre el soporte Octil agarosa (OC), ii) unión covalente sobre el soporte glioxil-agarosa (GLX), en algunos casos sobre Bromo cianógeno-agarosa (CNBr) y iii) inmovilizadas por adsorción interfacial (en primera instancia) y luego generando interacciones covalentes sobre el nuevo soporte heterofuncional Octil-glioxil-agarosa (OCGLX).

Figura 24. Metodología general propuesta para el estudio de los nuevos biocatalizadores inmovilizados sobre diferentes soportes



Una vez obtenidos los derivados enzimáticos, su actividad fue evaluada frente a la hidrólisis de diferentes sustratos; además, se estudió su posible reactivación mediante la técnica de desplegamiento (incubación en un agente desestabilizante o caotrópico) y replegamiento (incubación en medio acuoso) de proteínas (**figura 25**).

Figura 25. Reactivación de lipasas inmovilizadas sobre OCGLX agarosa mediante la técnica de desplegamiento y replegamiento de proteínas.



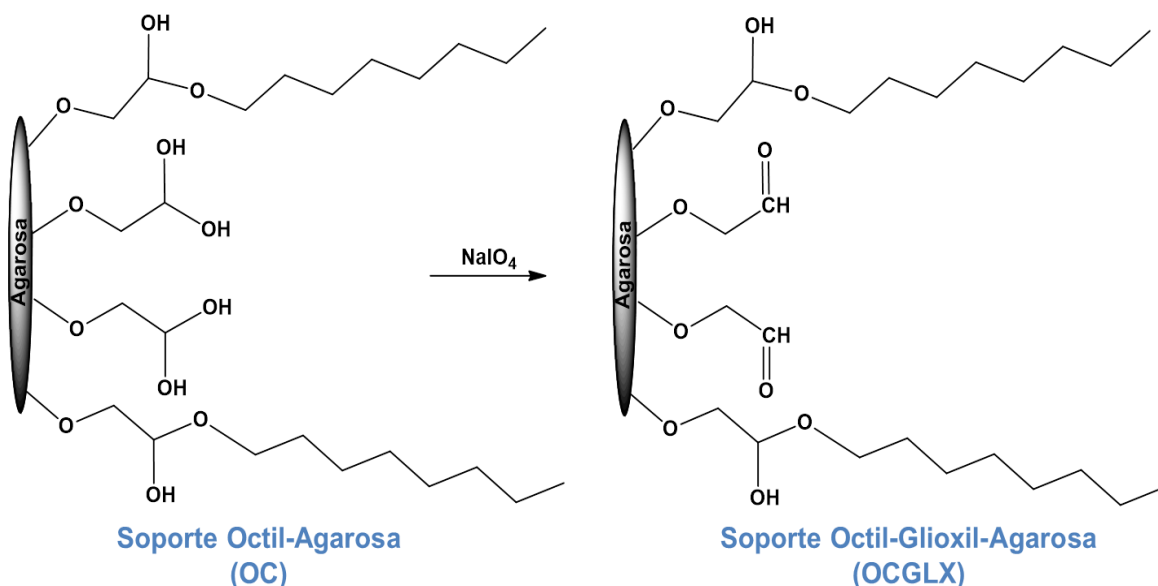
La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), usando como referencia albúmina de suero bovino. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se presentan como la media de este valor con una desviación estándar, usualmente, menor al 10%.

3.3.1 Preparación de soportes glioxil

La preparación de los dos soportes glioxil (usando directamente agarosa 4BCL u octil-agarosa 4BCL) activados respectivamente con 30 o 25 μmol de grupos

aldehído por gramo de soporte húmedo se llevó a cabo mediante la oxidación directa de los dioles, presentes en cada soporte (**Figura 26**), usando periodato de sodio (reacción equimolar) siguiendo el protocolo estándar descrito (Guisán, 1988; Mateo y col., 2006).

Figura 26. Preparación del soporte OCGLX agarosa.



Las suspensiones que contenían los soportes y el periodato de sodio fueron agitadas suavemente durante 3 horas a 25°C. Luego de transcurrido el tiempo de reacción, los soportes fueron filtrados y lavados con agua destilada. El periodato no consumido fue medido mediante titulación, de la solución filtrada, con yoduro de potasio (KI) en bicarbonato de sodio saturado (Nevell, 1963).

3.3.2 Inmovilización de enzimas

La inmovilización se llevó a cabo usando 1 o 5 mg de proteína por g de soporte húmedo, excepto en la determinación de carga máxima donde el volumen de enzima fue incrementado hasta alcanzar 60 mg de enzima por g de soporte.

3.3.2.1 Inmovilización de enzimas sobre los soportes octil (OC) y octil-glioxil (OCGLX) agarosa

Las muestras comerciales de enzimas fueron diluidas en el volumen correspondiente de buffer fosfato de sodio 5 mM a pH 7. Luego, 20 g de soporte fueron adicionados a 200 mL de solución enzimática manteniendo agitación suave y constante. Periódicamente, se extrajeron muestras de suspensión y sobrenadante durante la inmovilización para determinar la actividad enzimática en la hidrólisis de p-NPB (sección 3.4.1). Luego de la inmovilización las suspensiones fueron filtradas y la enzima soportada fue lavada varias veces con agua destilada.

En el caso de OCGLX, las enzimas inmovilizadas previamente fueron resuspendidas en buffer bicarbonato de sodio 50 mM a pH 10 por diferentes tiempos, para favorecer las interacciones covalentes enzima-soporte (Mateo y col., 2005).

3.3.2.2 Inmovilización de enzimas sobre el soporte glioxil (GLX) agarosa

Las enzimas fueron diluidas en buffer bicarbonato de sodio 50 mM a pH 10. Luego, el soporte fue suspendido en la solución enzimática bajo agitación suave y constante. Periódicamente, muestras de sobrenadante y suspensión fueron extraídas y su actividad enzimática fue medida en la hidrólisis de p-NPB (sección 3.4.1).

3.3.2.3 Reducción con borohidruro de sodio (NaBH_4)

Para finalizar la reacción covalente enzima-soporte, borohidruro de sodio sólido fue adicionado a una concentración de 1 mg/mL a las suspensiones de OCGLX y GLX (a pH 10) y fueron sometidas a agitación suave durante 30 minutos. Este tratamiento reduce las bases de Schiff reversibles a enlaces aminos secundarios muy estables y los grupos aldehído sin reaccionar a grupos hidroxilo inertes (Guisán, 1988; Mateo y col., 2006; Mateo y col., 2005; Rodrigues y col., 2011). Finalmente, los derivados reducidos fueron filtrados, lavados con abundante agua destilada y almacenados a 4°C.

3.3.2.4 Inmovilización de enzimas sobre el soporte CNBr

Debido a que la TLL no pudo ser inmovilizada sobre el soporte glioxil-agarosa (GLX), por ser inestable a valores de pH alcalinos (pH 10), el soporte CNBr fue usado como soporte alternativo en los estudios de reactivación de proteínas.

La enzima fue diluida en el volumen correspondiente de buffer fosfato de sodio 5 mM a pH 7. Luego, 20 gramos húmedos de soporte CNBr (activado previamente, sección 2.3.1) fueron adicionados a 200 mL de solución enzimática bajo agitación constante y 4°C. Periódicamente, se extrajeron muestras de suspensión y sobrenadante durante la inmovilización y su actividad enzimática fue determinada en la hidrólisis de p-NPB (sección 3.4.1). La suspensión fue filtrada y resuspendida en etanolamina 1 M a pH 8 durante 2 horas para finalizar la inmovilización. Finalmente, el biocatalizador obtenido fue lavado con abundante agua destilada y almacenado a 4°C.

3.3.3 Desorción de las enzimas de los soportes

Para analizar si las enzimas fueron realmente enlazadas covalentemente al soporte, y para mantener solamente las moléculas de enzima covalentemente unidas, los derivados OCGLX fueron incubados con una concentración creciente del detergente apropiado para cada lipasa, usando como referencia los derivados OC. Este tratamiento solamente libera las moléculas de enzima que fueron adsorbidas mediante activación interfacial sobre el soporte OC y OCGLX.

1 g de cada biocatalizador fue suspendido en 10 mL de buffer fosfato de sodio 10 mM a pH 7 y 25°C. Luego, Tritón X-100 (para CALB, RML y Lecitasa) o CTAB (para TLL) fue adicionado progresivamente hasta alcanzar una concentración final de 1.5% o 2% (v/v), respectivamente. Cada adición de detergente se realizó a intervalos de 30 minutos, tiempo durante el cual muestras de suspensión y sobrenadante fueron extraídas para determinar el porcentaje de enzima liberada (mediante la hidrólisis de p-NPB, sección 3.4.1) y realizar una nueva adición de detergente. Una suspensión de referencia, teniendo soporte inerte y la misma cantidad de lipasa fue sometida exactamente al mismo tratamiento, para detectar los efectos del detergente sobre la actividad o estabilidad enzimática.

3.3.5 Estudio de la estabilidad de los diferentes biocatalizadores lipásicos

3.3.5.1 Inactivación térmica de los diferentes biocatalizadores

1 g de derivado fue suspendido en 5 mL de buffer 50 mM de acetato de sodio a pH 5, fosfato de sodio a pH 7 o bicarbonato de sodio a pH 9 a diferentes temperaturas. Periódicamente, se extrajeron muestras de suspensión y su actividad fue medida en la hidrólisis de p-NPB (sección 3.4.1). La vida media fue calculada a partir de las cinéticas de inactivación observadas.

3.3.5.2 Inactivación de los diferentes biocatalizadores en presencia de co-solventes orgánicos

1 g de derivado fue incubado en 10 mL de mezclas de acetonitrilo (ACN) o 1,4-dioxano / TrisHCl 100 mM a pH 7 y 30°C. Periódicamente, muestras de suspensión fueron extraídas y su actividad fue medida mediante la hidrólisis de pNPB (sección 3.4.1). La vida media fue calculada partir de las cinéticas de inactivación observadas. Los co-solventes orgánicos presentes en las muestras no tuvieron un efecto significativo sobre la actividad enzimática.

3.3.6 Determinación de la actividad hidrolítica de los biocatalizadores frente a diferentes sustratos

3.3.6.1 Hidrólisis de hexanoato de etilo

La actividad enzimática de los derivados obtenidos fue evaluada en la hidrólisis de hexanoato de etilo; para ello, 200 mg de las enzimas inmovilizadas fueron adicionadas a 1 mL de una solución 25 mM de sustrato, preparada en buffer fosfato de sodio 50 mM a pH 7, en algunos casos conteniendo ACN para obtener un sistema homogéneo en lugar de un sistema bifásico. Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo agitación constante a 25 °C. Periódicamente, el progreso de la reacción fue monitoreado extrayendo a diferentes tiempos alícuotas del medio de reacción para analizar los productos formados y el sustrato consumido a través de HPLC en fase reversa, de acuerdo con lo descrito en la sección 3.4.2, hasta obtener conversiones entre el 20 – 30%.

3.3.6.2 Hidrólisis de R/S, R o S mandelato de metilo

La actividad enzimática de los derivados obtenidos fue evaluada en la hidrólisis de R/S mandelato de metilo; 200 mg de las enzimas inmovilizadas fueron adicionadas

a 1 mL de una solución 50 mM de sustrato, preparada en buffer fosfato de sodio 50 mM a pH 7. Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo agitación constante a 25 °C. Periódicamente, el progreso de la reacción fue monitoreado extrayendo a diferentes tiempos alícuotas del medio de reacción para analizar los productos formados y el sustrato consumido a través de HPLC en fase reversa, de acuerdo con lo descrito en la sección 3.4.2, hasta obtener conversiones entre el 20 – 30%.

3.3.4 Reactivación mediante desplegamiento y replegamiento de proteínas

Los biocatalizadores de CALB y TLL fueron sometidos a la técnica de reactivación de proteínas mediante desplegamiento (incubación en cloruro de guanidinio, posteriormente descrito en la sección 3.3.4.1) y replegamiento (incubación en buffer fosfato de sodio a pH 7), este tratamiento se realizó por 3 ciclos. Del mismo modo, CALB y TLL fueron inactivados en presencia de co-solventes orgánicos (90% dimetilformamida y 80% 1,4-dioxano, respectivamente) siguiendo el procedimiento previamente descrito en la sección 3.3.5.2. Luego de su inactivación, los derivados fueron sometidos a reactivación mediante desplegamiento y replegamiento, este tratamiento se realizó por 3 ciclos (inactivación en solventes, desplegamiento y replegamiento).

3.3.4.1 Incubación en cloruro de guanidinio

Los biocatalizadores de CALB y TLL (10 g) fueron incubados en 100 mL de guanidinio 9 M a 25°C por 12 horas manteniendo agitación constante. Luego, fueron filtrados y lavados con buffer fosfato de sodio 100 mM a pH 7 para remover el agente desnaturizante. Seguidamente, fueron resuspendidos en un volumen de 100 mL de la misma buffer fosfato. La actividad fue determinada periódicamente durante 24 horas (sección 3.4.1).

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.4.1 Determinación estándar de la actividad enzimática frente al p-NPB

La actividad catalítica de las lipasas se cuantificó midiendo el incremento de absorbancia a 348 nm (punto isosbético), producido por la formación del producto p-nitrofenol en la hidrólisis de p-NPB 0.4 mM (disuelto en buffer fosfato de sodio 25 mM) a pH 7 y 25 °C ($\epsilon = 5150 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ bajo estas condiciones). Para iniciar la reacción, 50 – 200 μL de solución lipásica o suspensión se añadieron a 2.5 mL de la solución del sustrato. Una unidad de actividad enzimática (U) fue definida como la cantidad de enzima que es necesaria para hidrolizar 1 μmol de p-NPB por minuto bajo las condiciones descritas previamente.

3.4.2 Determinación del grado de hidrólisis de diferentes sustratos mediante HPLC

Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de ácido por minuto bajo las condiciones descritas en esta sección. La actividad fue determinada por triplicado con un máximo de conversión del 20 – 30%, los resultados se presentan como la media de este valor.

3.4.2.1 Hidrólisis de hexanoato de etilo

El grado de conversión se analizó mediante HPLC en fase reversa (Spectra Physic SP 100) acoplado a un detector UV (Spectra Physic SP 8450) y utilizando una columna Kromasil C18 (15 cm x 0.46 cm) suministrada por Análisis Vínicos (España). Las muestras (20 μL) fueron eluidas en una fase móvil de acetonitrilo y acetato de amonio 10 mM a pH 3.2 (en proporción 50:50, v/v) y a un flujo de 1.0 mL/min. La longitud de onda empleada en el análisis fue de 208 nm. Cuando se presentó un sistema bifásico, una muestra de 100 μL fue extraída bajo agitación

fuerte, mezclada con un volumen de ACN y filtrada antes de ser inyectada. El ácido hexanoico tuvo un tiempo de retención de 3.4 min y el éster (hexanoato de etilo) un tiempo de retención de 14.2 min.

3.4.2.2 Hidrólisis de mandelato de metilo

El grado de conversión se analizó mediante HPLC en fase reversa (Spectra Physic SP 100) acoplado a un detector UV (Spectra Physic SP 8450) y utilizando una columna Kromasil C18 (15 cm x 0.46 cm) suministrada por Análisis Vínicos (España). Las muestras (20 µL) fueron eluidas en una fase móvil de acetonitrilo y acetato de amonio 10 mM a pH 3.2 (en proporción 35:65, v/v) y a un flujo de 1.0 mL/min. La longitud de onda empleada en el análisis fue de 230 nm. El ácido mandélico tuvo un tiempo de retención de 2.5 min y el éster (mandelato de metilo) un tiempo de retención de 6 min.

3.4.3 Análisis mediante SDS-PAGE

El análisis en geles de poliacrilamida se llevó a cabo de acuerdo con la metodología propuesta por Laemmli (1970), usando el sistema de electroforesis Mini-PROTEAN® (Bio-rad). 100 mg del respectivo derivado enzimático fueron re-suspendidos en 1 mL de buffer de ruptura (2% SDS y 10% mercaptoetanol) y calentadas hasta ebullición durante 5 minutos. Una alícuota de 20 µL del sobrenadante fue usada en los experimentos y posteriormente analizada usando geles de corrido al 12 %(p/v), en una zona de separación de 9 cm x 6 cm. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente y 150 mV de voltaje constante durante 90 min. El revelado de las proteínas se realizó mediante tinción con azul brillante de Coomassie R-250. Los marcadores de peso molecular (10 a 200 kDa) usados fueron de Fermentas.

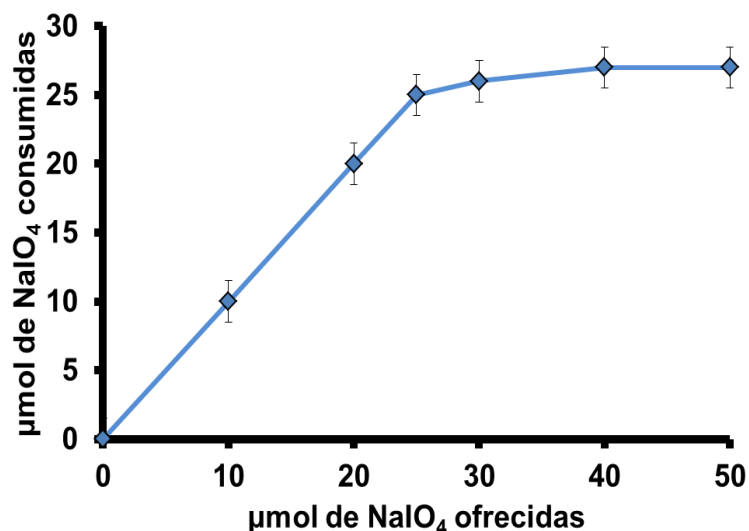
3.5 RESULTADOS

3.5.1 Preparación del soporte OCGLX agarosa

El grupo octilo, presente en el soporte Octil-agarosa, se acopla covalentemente a una matriz reticular al 4% de agarosa mediante un enlace éter, generando grupos diol durante este proceso. Una característica importante de los dioles vecinales es su ruptura oxidativa con el tratamiento de ácido peryódico (HIO_4) o periodato de sodio (NaIO_4), donde el enlace carbono-carbono, en una unidad de diol vecinal, se rompe y se obtiene un compuesto carbonílico o aldehído.

En consecuencia, el soporte octil-agarosa fue sometido a oxidación con periodato de sodio; obteniendo como resultado, 25 μmol de grupos aldehído por gramo de soporte húmedo (**figura 27**), determinados mediante titulación del periodato que no reaccionó. Además, el soporte fue sometido a la prueba de Schiff, donde el aldehído reacciona con el reactivo fucsina-aldehído produciendo un color violeta característico, el cual corroboró cualitativamente la existencia de grupos aldehído en el soporte.

Figura 27. Oxidación del soporte OC para obtener el soporte OCGLX agarosa



La modificación del soporte comercial agarosa 4BCL, inicialmente con glicidol y posteriormente oxidado con periodato de sodio, generó alrededor de 70 μmol de grupos aldehído (glioxil) por gramo de soporte (López-Gallego y col., 2005; Mateo y col., 2005 y 2006). Por el contrario, 30 μmol de grupos glioxil por gramo de soporte fueron obtenidos mediante la oxidación directa del soporte agarosa con periodato de sodio; a pesar del bajo número de grupos aldehído presentes en el soporte GLX-agarosa, que son comparables con los presentes en OCGLX-agarosa (25 μmol), este soporte monofuncional fue usado como referencia en posteriores estudios.

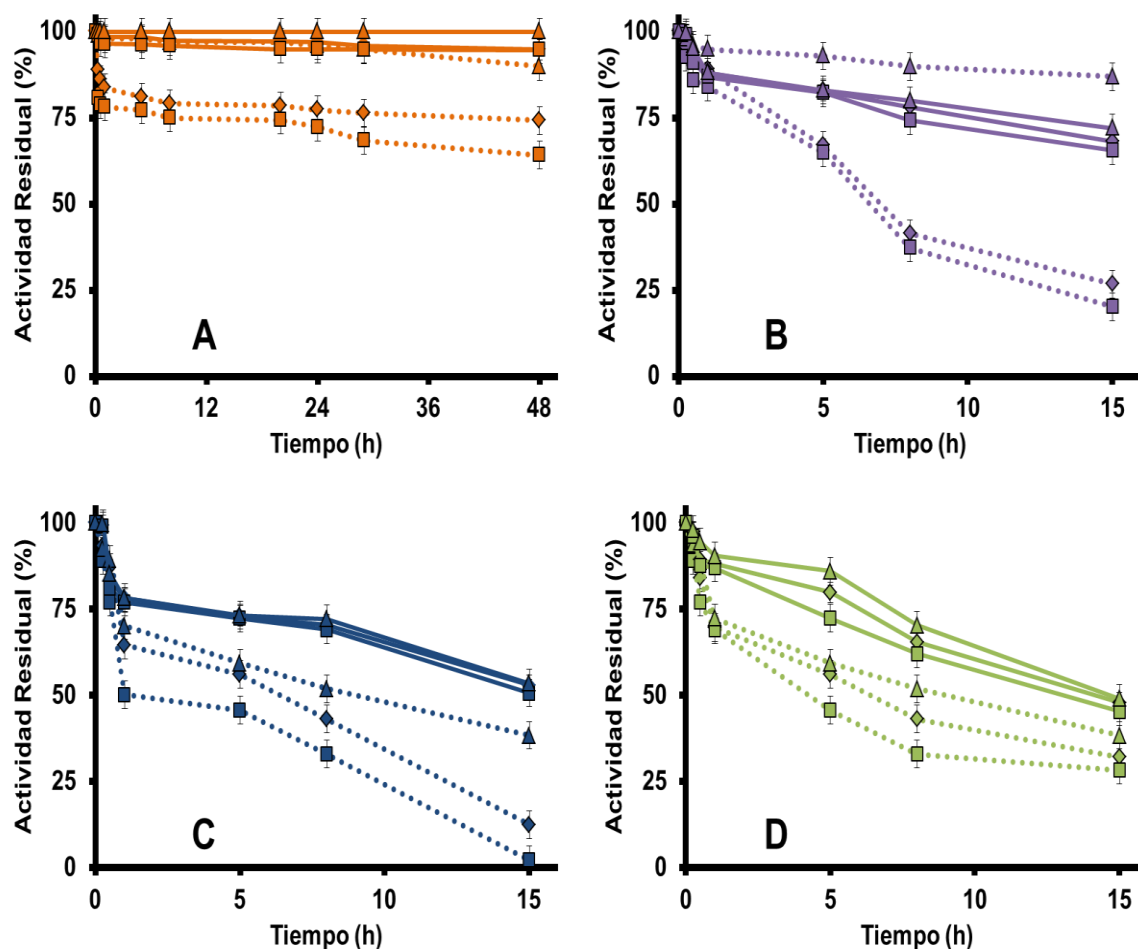
3.5.2 Inmovilización de lipasas sobre los soportes octil (OC), glioxil (GLX) y octil-glioxil (OCGLX) agarosa.

Las **figuras 28 y 29** muestran las cinéticas de inmovilización de las lipasas sobre los diferentes soportes monofuncionales (OC y GLX) y el heterofuncional (OCGLX). La velocidad de inmovilización de las lipasas fue más baja sobre el

soporte GLX agarosa que sobre cualquiera de los soportes octil. Además, en tres de los cuatro casos, las enzimas se inactivaron casi totalmente al ser inmovilizadas sobre el soporte GLX (**figura 28**), lo cual reflejó la baja estabilidad enzimática a pH 10 de las lipasas de Lecitasa, RML y TLL (Rodrigues y col., 2009).

El uso de mercaptoetanol (compuesto usado en la estabilización de enlaces imino, Bolivar y col., 2009) mejoró el rendimiento de inmovilización en todos los casos. Sin embargo, no solucionó los problemas de inactivación de las enzimas durante el proceso e incluso disminuyó o afectó negativamente la estabilidad de las lipasas solubles. La CALB inmovilizada sobre el soporte GLX bajó alrededor de un 30% de su actividad inicial luego de 48 horas en presencia de mercaptoetanol 10 mM. El mercaptoetanol, a pesar de mejorar los rendimientos de inmovilización de las lipasas, no generó biocatalizadores activos. Por lo anterior, solamente el derivado GLXCALB pudo ser preparado para posteriores comparaciones con los biocatalizadores OCGLX.

Figura 28. Cinéticas de inmovilización de las diferentes lipasas sobre el soporte glioxil agarosa. Los experimentos se llevaron a cabo como se describió previamente, usando buffer bicarbonato de sodio 50 mM a pH 10, en algunos casos conteniendo mercaptoetanol 10 mM. Línea punteada: con mercaptoetanol, Línea sólida: sin mercaptoetanol. Panel A: CALB, Panel B: Lecitasa, Panel C: RML y Panel D: TLL. Rombos: suspensión, cuadrados: sobrenadante y triángulos: enzima soluble.

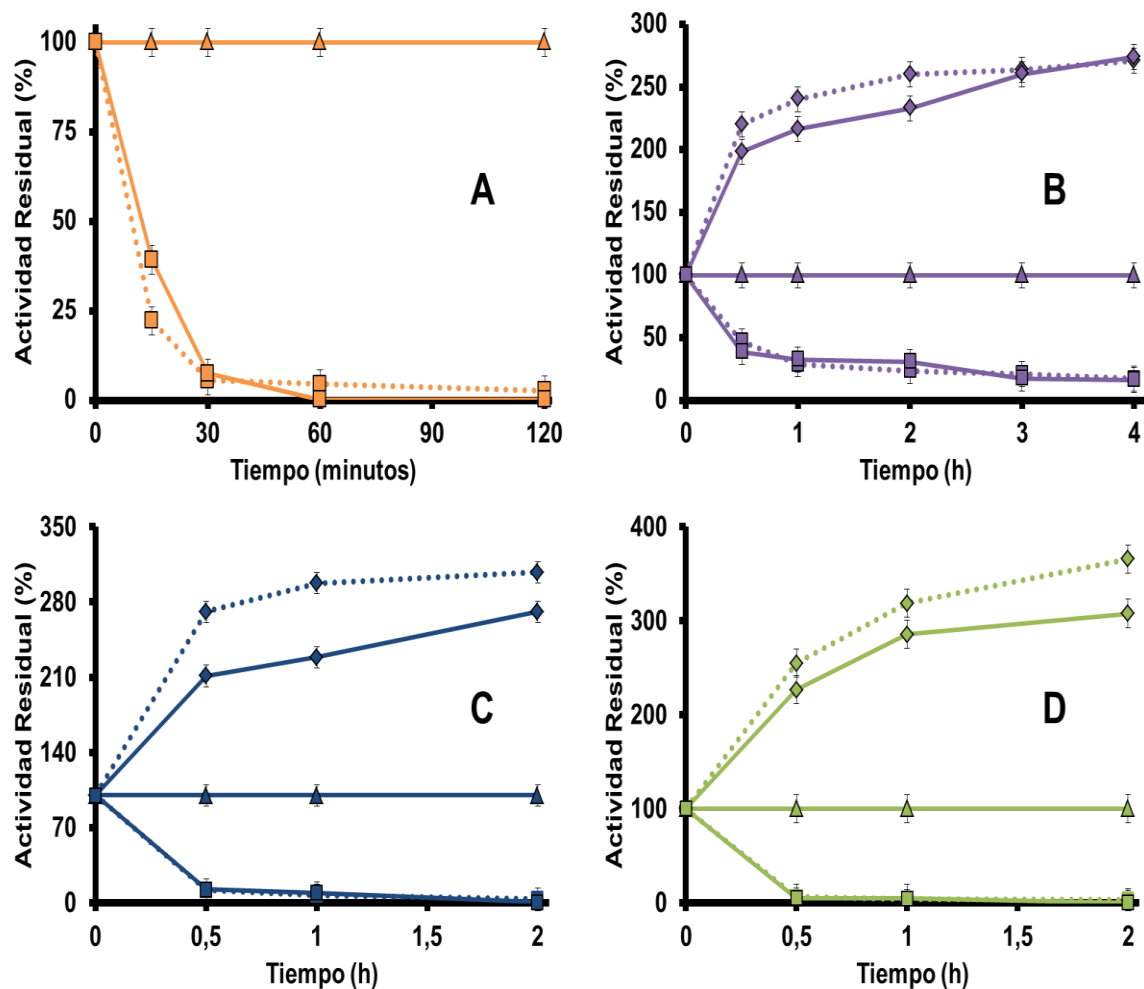


La inmovilización de las enzimas sobre el soporte OCGLX se llevó a cabo en buffer fosfato de sodio a pH 7; este valor de pH fue usado ya que no se inmovilizó ninguna lipasa sobre los soportes GLX. En consecuencia, la inmovilización sobre

el soporte OCGLX se llevó a cabo, en primera instancia, mediante activación interfacial de las enzimas. Esto era lo esperado, ya que la inmovilización de proteínas sobre soportes glioxil involucra los grupos Lys de las proteínas (Guisan, 1988; Mateo y col., 2005 y 2006), y a pH 7 los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina (Lys) estarán en una forma ionizada y por lo tanto no serán reactivos.

Las velocidades de inmovilización de las lipasas (CALB, TLL, RML y Lecitasa) sobre el soporte OC (**Figura 29**) fueron muy altas y la actividad enzimática incrementó significativamente durante la inmovilización, como se ha descrito previamente (Fernandez-Lafuente y col., 1998; Bastida y col., 1998). La lecitasa alcanzó una actividad del 270% comparada con la inicial. RML y TLL incrementaron su actividad a más del 300%, en consecuencia del desplazamiento del equilibrio conformacional de las lipasas en el cual, fijan su forma abierta sobre la estructura hidrofóbica (Bastida et al., 1998) La CALB es la única enzima que mantiene su actividad casi inalterada luego de su inmovilización sobre el soporte octil, debido al pequeño lid que no aísla completamente el centro activo del medio de reacción (Uppenberg y col., 1994).

Figura 29. Cinéticas de inmovilización de las diferentes lipasas sobre los soportes octil y octil-glioxil agarosa. Los experimentos se llevaron a cabo como se describió previamente, usando buffer fosfato de sodio 5 mM a pH 7. Línea punteada: soporte OC, Línea sólida: soporte OCGLX. Panel A: CALB, Panel B: Lecitasa, Panel C: RML y Panel D: TLL. Rombos: suspensión, cuadrados: sobrenadante y triángulos: enzima soluble.



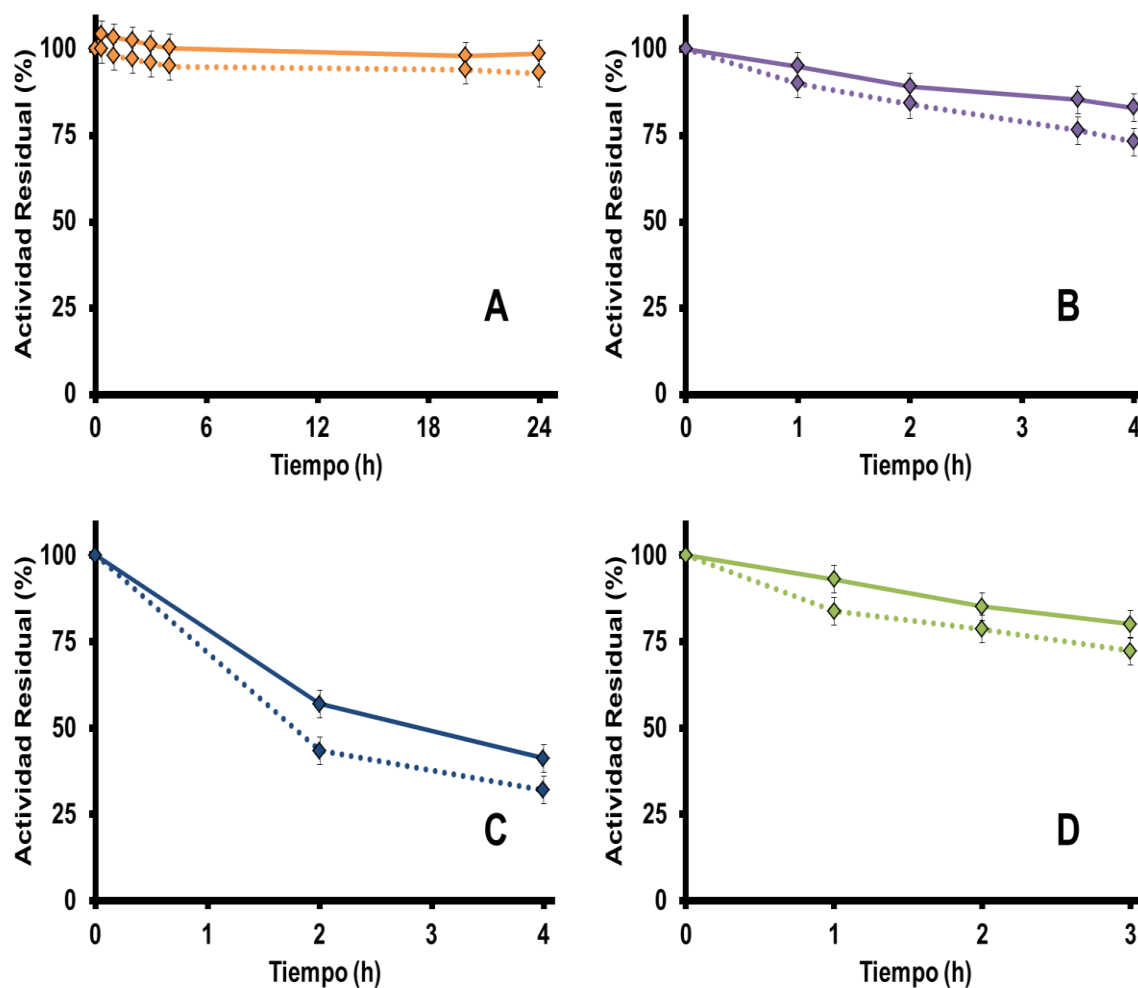
El uso de soportes OCGLX (**figura 29**) sobre la actividad enzimática tiene un efecto similar al observado usando octil-agarosa; además, produce una velocidad de inmovilización ligeramente más alta comparada con el soporte OC en todos los

casos, quizás porque el soporte es ligeramente más hidrofóbico que el OC, ya que dos grupos hidroxilo que interactúan con el medio, mediante puentes de hidrógeno, fueron remplazados por un grupo aldehído (**figura 26**).

Para comprobar si las moléculas de enzimas se han unido covalentemente al soporte, las preparaciones inmovilizadas a pH 7 sobre OCGLX, fueron reducidas con borohidruro (con el objetivo de evitar la liberación de las moléculas de enzima, unidas covalentemente, al medio de reacción) y analizadas mediante SDS-PAGE. La reactividad de los grupos amino de las enzimas a pH 7 no fue lo suficientemente alta para producir una unión covalente con los grupos glioxil (Bolivar y col., 2009), generando la desorción de las moléculas inmovilizadas (los resultados no se muestran) luego de que los biocatalizadores fueron sometidos a ebullición en presencia de SDS y mercaptoetanol.

Por lo anterior, el valor del pH del medio fue incrementado luego de la adsorción sobre OCGLX para favorecer la reactividad enzima-soporte, ya que a valores alcalinos de pH los grupos ϵ amino de las Lys incrementan su reactividad con los grupos glioxil (Mateo y col., 2005). Además, se analizó el efecto del mercaptoetanol sobre la inmovilización covalente de las moléculas de enzima adsorbida; teniendo en cuenta estudios realizados anteriormente, el mercaptoetanol es capaz de estabilizar los enlaces imino generados por la interacción entre las Lys de la enzima y los grupos glioxil del soporte (Bolivar y col., 2009). La **figura 30** muestra el efecto de esta incubación a pH 10 sobre las actividades de las cuatro enzimas.

Figura 30. Efecto de la incubación a pH 10 sobre las enzimas inmovilizadas sobre el soporte OCGLX agarosa. Los experimentos se llevaron a cabo como se describió previamente, usando buffer bicarbonato de sodio 50 mM a pH 10. Línea sólida: sin mercaptoetanol, Línea punteada: con mercaptoetanol. Panel A: CALB, Panel B: Lecitasa, Panel C: RML y Panel D: TLL.



En general, la presencia de mercaptoetanol en el medio de inmovilización covalente (pH 10), generó una disminución en la actividad de las enzimas. Luego de 24 horas de incubación a pH 10, OCGLXCALB retuvo su actividad enzimática casi inalterada (98%). En el caso de la Lecitasa, después de 4 horas, el derivado

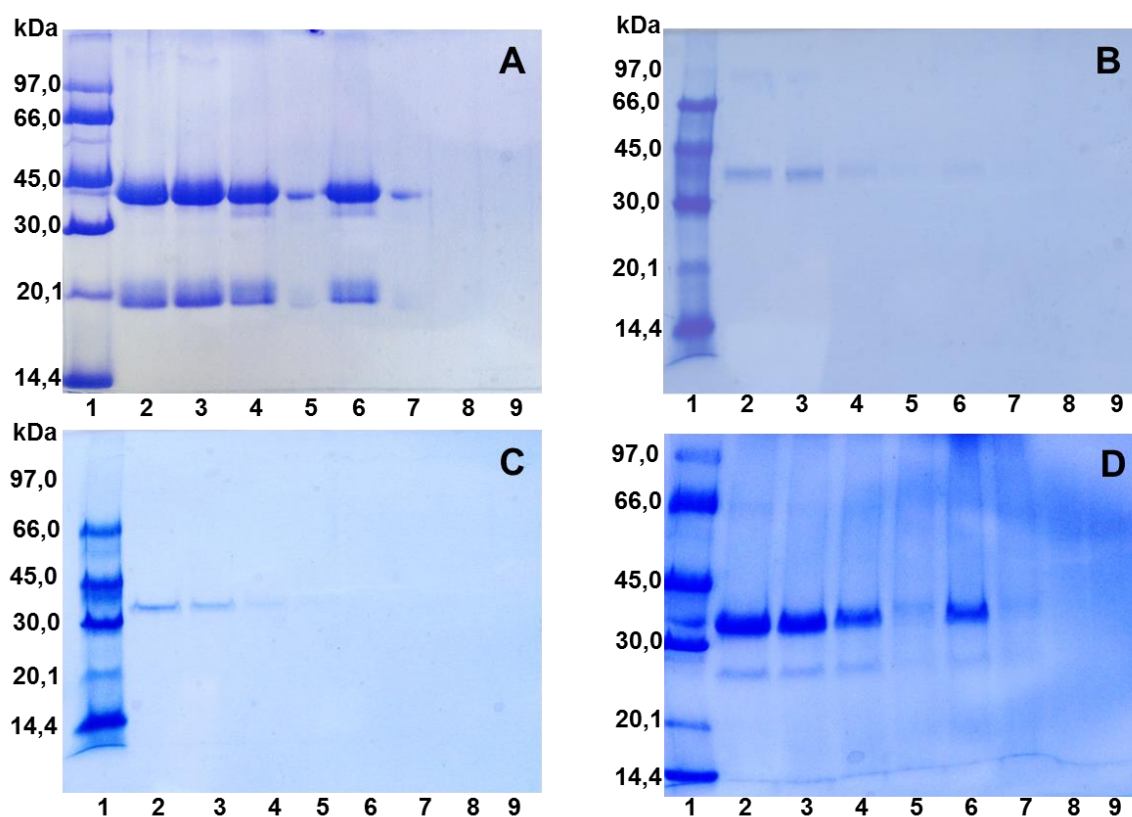
disminuyó su actividad en un 17%. La RML, luego de 4 horas de incubación tuvo una caída de actividad hasta el 41% y hasta 32% en ausencia y presencia de mercaptoetanol, respectivamente. La actividad de TLL disminuyó, luego de la incubación a pH 10 durante 4 horas, solamente un 20%, que se convirtió en 28% en presencia de mercaptoetanol. Estos resultados contrastan con los obtenidos cuando la TLL fue inmovilizada directamente a pH 10 sobre GLX, donde la enzima fue inactivada casi totalmente (Rodrigues y col., 2009); esta diferencia se debe a que las lipasas inmovilizadas en soportes hidrofóbicos por activación interfacial son más estables que las inmovilizadas sobre otras superficies no hidrofóbicas, e incluso mejoran su estabilidad a valores de pH alcalinos (Fernandez-Lafuente, 2010).

3.5.3 Análisis mediante SDS-PAGE

El análisis mediante SDS-PAGE (**figura 31**) de las enzimas desorbidas de los soportes mostró, que para CALB, RML y Lecitasa, solamente alrededor del 15% de la enzima puede ser desorbida, lo cual implica más del 85% de moléculas enzimáticas covalentemente unidas al soporte. Usando TLL, alrededor del 30% de la enzima fue desorbida (unida únicamente mediante adsorción al soporte OCGLX), implicando solamente un 70% de moléculas unidas covalentemente. La presencia del mercaptoetanol (durante la inmovilización covalente), no fue relevante, sugiriendo que a pH 10 la estabilización de los grupos imino no es necesaria en este tipo de soporte.

Figura 31. Análisis mediante SDS-PAGE de los diferentes biocatalizadores.

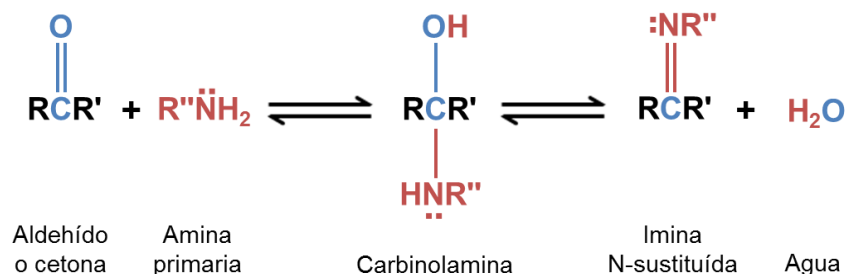
Las enzimas inmovilizadas fueron sometidas a los procesos previamente descritos. Panel A: CALB, Panel B: Lecitasa, Panel C: RML y Panel D: TLL. Línea 1: Marcador de peso molecular; Línea 2: OC; Línea 3: OCGLX, Línea 4: OCGLX incubado a pH 10; Línea 5: OCGLX incubado a pH 10 y reducido con NaBH₄; Línea 6: OCGLX incubado a pH 10 con mercaptoetanol; Línea 7: OCGLX incubado a pH 10 con mercaptoetanol y reducido con NaBH₄; Línea 8: OCGLX incubado a pH 10, reducido con NaBH₄ y lavado con detergente; Línea 9: OCGLX incubado a pH 10 con mercaptoetanol, reducido con NaBH₄ y lavado con detergente.



Los grupos imino o bases de Schiff son compuestos formados por condensación (reacción en dos pasos) de una amina con un compuesto carbonílico. En el primer

paso de la reacción, ocurre una adición nucleófila de la amina al grupo carbonilo para dar una especie conocida como carbinolamina. Una vez formada, la carbinolamina se deshidrata para dar el producto de reacción, una imina N-sustituída (**figura 32**). Se observó una banda de los derivados OCGLX no reducidos con borohidruro (**figura 31**), con una intensidad similar a la obtenida analizando la preparación OC, debido a la reversibilidad de los grupos imino (Guisán, 1988; Mateo y col., 2006; Mateo y col., 2005; Rodrigues y col., 2011).

Figura 32. Formación reversible de iminas.



Los biocatalizadores OCGLX fueron incubados y lavados con la concentración de detergente correspondiente (Tritón X-100 0.3% para RML, 1% para CALB y Lecitasa y 0.7% de CTAB para TLL), para desorber todas las moléculas enzimáticas adsorbidas sobre el soporte. El análisis mediante SDS-PAGE de los 4 derivados OCGLX lavados con detergente (**Figura 31**) reveló que la mayoría de moléculas permanecen covalentemente ligadas al soporte. Las propiedades de estos derivados fueron evaluadas, comparadas con octil y, en el caso de CALB, con los derivados glioxil.

3.5.4 Estabilidad Térmica de los diferentes biocatalizadores

La **tabla 6** muestra la vida media de las diferentes preparaciones a pH 5, 7 y 9. Los derivados CALB de OCGLX fueron más estables que los OC, excepto a pH 5. El factor de estabilización a pH 9 fue alrededor de 10 y de 4.5 a pH 7, la incubación de OCGLX en presencia de mercaptoetanol para estabilizar los enlaces imino enzima-soporte durante la preparación de los biocatalizadores redujo la estabilidad de la enzima en comparación con el derivado OCGLX; además, el biocatalizador GLXCALB fue el menos estable en todos los valores de pH estudiados.

En el caso de la Lecitasa, a pH 5, la estabilización de OCGLX comparado con OC alcanzó un valor de 12, a pH 7 de 7.7 veces y a pH de 4.9, la presencia de mercaptoetanol durante la incubación alcalina, no alteró la estabilidad de la enzima. Para RML, la estabilización obtenida fue de 12 a pH 5, 4 a pH 7 y 7.8 veces a pH 9. La presencia de mercaptoetanol durante la incubación alcalina produjo un ligero incremento en la estabilidad a pH 7, no tuvo efecto a pH 9 y fue negativo a pH 5.

El OCGLXTLL fue el único derivado con menor estabilidad que el OCTLL, quizás debido a que es la única preparación con tan solo un 70% de moléculas enzimáticas inmovilizadas covalentemente.

Tabla 6. Vida media (en minutos) de los diferentes biocatalizadores inactivados térmicamente. Los experimentos se llevaron a cabo como se describió previamente. CALB (pH 5 – 80°C, pH 7 – 70°C, pH 9 – 60°C), Lecitasa y RML (pH 5 – 60°C, pH 7 – 50°C, pH 9 – 45°C) y TLL (70°C en pH 5 y pH 7, pH 9 – 60°C).

CONDICIONES EXPERIMENTALES			
BIOCATALIZADOR	pH 5	pH 7	pH 9
OCCALB	150 ± 7.5	24 ± 1.2	10 ± 0.5
OCGLXCALB pH 10	120 ± 6.0	108 ± 5.4	100 ± 5.0
OCGLXCALB pH 10 – Mercaptoetanol	108 ± 5.4	88 ± 4.4	80 ± 4.0
GLXCALB	5 ± 0.3	5 ± 0.3	5 ± 0.3
OCLU	5 ± 0.3	110 ± 5.5	105 ± 5.3
OCGLXLU pH 10	60 ± 3.0	850 ± 42.5	515 ± 25.8
OCGLXLU pH 10 – Mercaptoetanol	60 ± 3.0	850 ± 42.5	515 ± 25.8
OCRML	10 ± 0.5	42 ± 2.1	5 ± 0.3
OCGLXRML pH 10	120 ± 6.0	168 ± 0.9	39 ± 2.0
OCGLXRML pH 10 – Mercaptoetanol	100 ± 5.0	180 ± 9.0	42 ± 2.1
OCTLL	240 ± 12.0	150 ± 7.5	492 ± 24.6
OCGLXTLL pH 10	180 ± 9.0	30 ± 1.5	150 ± 7.5
OCGLXTLL pH 10 – Mercaptoetanol	210 ± 10.5	30 ± 1.5	150 ± 7.5

3.5.5 Estabilidad de los derivados en solventes orgánicos

Los derivados enzimáticos fueron incubados en solventes orgánicos a diferentes concentraciones en condiciones donde las preparaciones OC se inactivaran significativamente en un tiempo razonable (**Tabla 7**).

Tabla 7. Vida media (en minutos) de los diferentes biocatalizadores inactivados en solventes orgánicos. Los derivados fueron incubados a 30°C. Los experimentos se llevaron a cabo como se describió previamente.

CONDICIONES EXPERIMENTALES				
BIOCATALIZADOR	Dioxano		ACN	
	80%	60%	45%	30%
OCCALB	144 ± 7.2	-	-	-
OCGLXCALB pH 10	240 ± 12.0	-	-	-
OCGLXCALB pH 10 (Merc.)	150 ± 7.5	-	-	-
GLXCALB	192 ± 9.6	-	-	-
OCLU	-	-	5 ± 0.3	-
OCGLXLU pH 10	-	-	15 ± 0.8	-
OCGLXLU pH 10 (Merc.)	-	-	15 ± 0.8	-
OCRML	-	-	-	5 ± 0.3
OCGLXRML pH 10	-	-	-	30 ± 1.5
OCGLXRML pH 10 (Merc.)	-	-	-	30 ± 1.5
OCTLL	-	72 ± 3.6	-	-
OCGLXTLL pH 10	-	860 ± 43.0	-	-
OCGLXTLL pH 10 (Merc.)	-	860 ± 43.0	-	-

En oposición a los resultados obtenidos en las inactivaciones térmicas, el derivado OCCALB, inactivado a 30°C en 80% dioxano a pH 7, fue el menos estable, incluso que el GLXCALB (33% más estable en comparación con OC). El derivado más estable fue el OCGLXCALB, con un factor de estabilización de 1.67; el derivado incubado en mercaptoetanol (Merc.) no tuvo una diferencia significativa en su estabilidad comparado con el OC. La baja estabilidad de las lipasas inmovilizadas por adsorción hidrofóbica comparada con las inmovilizadas mediante unión

covalente puede estar relacionada con las débiles interacciones enzima-soporte causadas por la presencia del solvente orgánico.

El derivado OCGLX de la Lecitasa y de RML, comparado con la enzima inmovilizada sobre el soporte OC, fue alrededor de 3 y 6 veces más estable, respectivamente. Para TLL, la vida media de OCGLX en 60% dioxano a pH 7 y 30°C fue 11.9 veces más alta que de OC. En general, para estas tres enzimas, la incubación en presencia de mercaptoetanol durante la preparación de los biocatalizadores no alteró los resultados finales. Excepto en el caso de CALB, las estabilizaciones observadas en presencia de solventes orgánicos fueron significativas mediante el uso del soporte OCGLX en lugar del OC, sugiriendo que la inmovilización covalente puede jugar un rol importante en la estabilidad enzimática en este medio.

En general, los resultados reflejan que la polaridad del solvente orgánico influye en la actividad y estabilidad de la enzima, ya que un descenso en la constante dieléctrica del medio permite un aumento de las interacciones electroestáticas entre residuos cargados en la enzima, conduciendo a una disminución de su flexibilidad y en consecuencia una disminución en la actividad catalítica de la enzima (Illanes, 1994; Gutierrez, 2001).

3.5.6 Desorción de las enzimas de los soportes OC durante su inactivación térmica y en solventes orgánicos

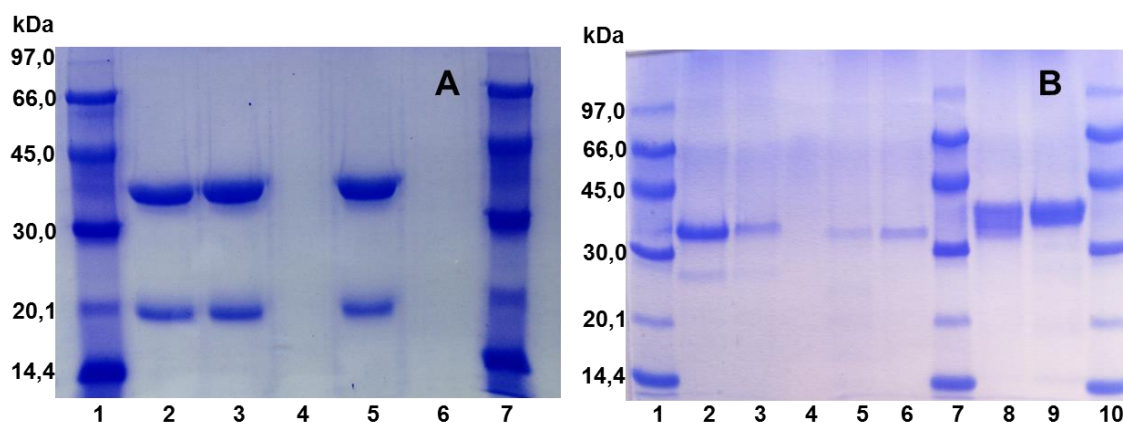
Como se visualizó previamente en la **figura 31**, la enzima no puede ser desorbida de los soportes OCGLX durante la inactivación, incluso en el tratamiento para la SDS-PAGE la enzima se mantiene unida al soporte, debido a la alta estabilidad de los enlaces amino secundarios formados entre la enzima y el soporte luego de la reducción. Para comprobar si las preparaciones OC-lipasa liberan moléculas de enzima durante las inactivaciones térmicas y en solventes orgánicos, la cantidad

de proteína adsorbida al soporte antes y después de las inactivaciones fue comparada usando el análisis mediante SDS-PAGE.

Como se mencionó previamente, el tratamiento de los derivados, para realizar el análisis mediante SDS-PAGE, genera la liberación de toda la proteína inmovilizada sobre el soporte OC al medio. Por lo cual, las preparaciones OC de las 4 diferentes enzimas antes y después de la inactivación fueron sometidas a este estudio. La **figura 33** muestra que la cantidad de enzima en los soportes octil, luego de ser inactivada en solventes orgánicos, disminuyó significativamente durante la inactivación. La desorción de la enzima covalentemente unida al soporte mediante enlaces amino secundarios no es posible, incrementando el interés de esta nueva metodología.

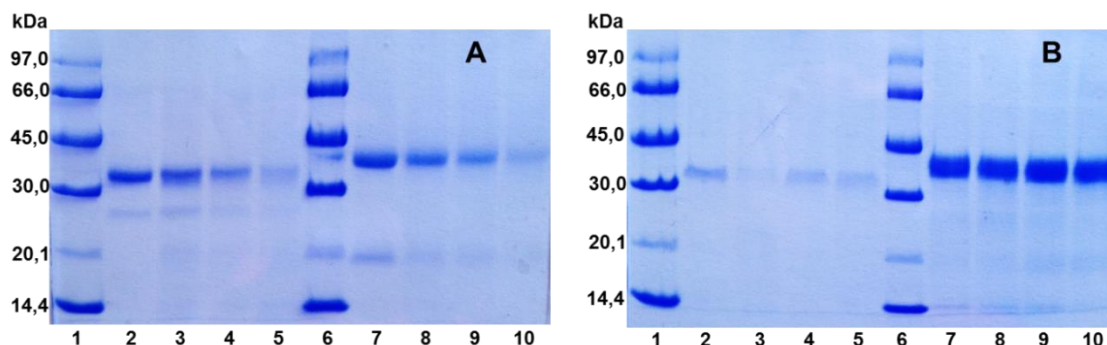
La pérdida de estabilidad de los derivados OC, puede estar relacionada con la desorción de moléculas enzimáticas del soporte en presencia de solventes orgánicos (**figura 33**); ya que las moléculas lipásicas unidas mediante adsorción son desorbidas e inactivadas en el medio de reacción. CALB fue una excepción, la enzima no fue desorbida del soporte durante la inactivación en medio orgánico, lo cual explica la estabilización observada con esta enzima en presencia de solventes orgánicos (similar a la de sus derivados OCGLX).

Figura 33. Análisis mediante SDS-PAGE de los diferentes biocatalizadores Octil-lipasa luego de su inactivación en presencia de solventes orgánicos a pH 7, 30°C y 8 horas. Las enzimas inmovilizadas fueron sometidas a los procesos previamente descritos. Panel A: OCCALB; Líneas 1 y 7: Marcador de peso molecular, Línea 2: OCCALB, Línea 3: OCCALB incubada en 90% dioxano y Línea 5: OCCALB incubada en 90% ACN. Panel B: TLL, RML y Lecitasa; Líneas 1, 7 Y 10: Marcador de peso molecular, Línea 2: OCTLL, Línea 3: OCTLL incubada en 60% dioxano, Línea 5: OCRML incubada en 30% ACN, Línea 6: OCRML, Línea 8: OCLecitasa y Línea 9: OCLecitasa incubada en 45% ACN.



Un análisis similar con los derivados OC-lipasa fue llevado a cabo luego de ser inactivados térmicamente en medio acuoso a diferentes valores de pH. La **figura 34** muestra que se presentó la desorción de la enzima inmovilizada sobre el soporte octil al medio a altas temperaturas, que pudo ocurrir antes o después de su inactivación y, en todos los casos, la enzima pudo ser incorporada al medio de reacción y contaminar el producto. Esto puede explicar los efectos positivos de las uniones covalentes en la inactivación térmica. La inactivación térmica de la Lecitasa no produjo una desorción significativa de la enzima del soporte octil bajo todas las condiciones a la cual fue estudiada; lo cual, no es una prueba clara de la estabilización del derivado OCGLX frente al OC de la Lecitasa.

Figura 34. Análisis mediante SDS-PAGE de los diferentes biocatalizadores Octil-lipasa luego de su inactivación térmica a diferentes valores de pH y temperatura durante 8 horas. Las enzimas inmovilizadas fueron sometidas a los procesos previamente descritos. Panel A; Línea 1 y 6: Marcador de peso molecular, Línea 2: OCTLL, Línea 3: OCTLL incubada a pH 5 y 70°C; Línea 4: OCTLL incubada a pH 7 y 70°C, Línea 5: OCTLL incubada a pH 9 y 60°C, Línea 7: OCCALB, Línea 8: OCCALB incubada a pH 5 y 70°C, Línea 9: OCCALB incubada a pH 7 y 70°C, Línea 10: OCCALB incubada a pH 9 y 60°C. Panel B; Línea 1 y 6: Marcador de peso molecular, Línea 2: OCRML, Línea 3: OCRML incubada a pH 5 y 60°C, Línea 4: OCRML incubada a pH 7 y 50°C, Línea 5: OCRML incubada a pH 9 y 45°C, Línea 7: OCLecitasa, Línea 8: OCLecitasa incubada a pH 5 y 60°C, Línea 9: OCLecitasa incubada a pH 7 y 50°C, Línea 10: OCLecitasa incubada a pH 9 y 45°C.



La desorción de la enzima del soporte OC puede ser una razón para la baja estabilización enzimática, tanto en la inactivación térmica como en solventes orgánicos. Esto también es relevante debido a que la desorción de la enzima del soporte ocasiona una “contaminación” del medio de reacción, generando dificultades en la pureza del producto final, un punto muy importante a tener en cuenta si la enzima es usada en la industria alimenticia.

3.5.7 Actividad de los diferentes biocatalizadores frente a diversos sustratos

La actividad de los biocatalizadores frente a dos diferentes sustratos, metil mandelato y etil hexanoato, se muestra en la **tabla 8**.

En la hidrólisis de mandelato de metilo en medio acuoso, OCCALB y OCGLXCALB presentaron actividades muy similares por mg de enzima inmovilizada, casi triplicando la actividad del derivado GLXCALB; probablemente a causa de la estabilización de la forma abierta de la enzima. La actividad frente al hexanoato de etilo fue determinada en concentraciones crecientes de acetonitrilo (de 50 a 90%); en presencia de solvente la actividad de CALB disminuyó, siendo más pronunciada en OCCALB. Se puede apreciar que GLXCALB, comparada con OCGLX, fue 9 veces menos activa en 50% de acetonitrilo y 4 veces menos en 90% del mismo solvente; asimismo, en presencia de 90% de acetonitrilo, el OCGLX fue el derivado más activo en un 30% comparada con OCCALB. En consecuencia, la especificidad de GLXCALB fue diferente en comparación con OCCALB (al comparar el resultado en medio acuoso con los dos sustratos), mientras que los solventes orgánicos tuvieron un bajo impacto sobre la actividad de los derivados covalentes; además, OC y OCGLX presentaron una especificidad similar pero diferente resistencia a los solventes orgánicos.

Tabla 8. Actividad de los diferentes biocatalizadores frente a *R/S* mandelato de metilo (50 mM) y hexanoato de etilo (25 mM) a pH 7 y 25°C. Los experimentos se realizaron como se describió previamente. La actividad es presentada en μ moles de sustrato hidrolizado por minuto y mg de enzima inmovilizada. *Actividad ($\times 10^3$), ** Actividad ($\times 10^2$).

SUSTRATO Y CONDICIONES EXPERIMENTALES				
BIOCATALIZADOR	Mandelato de metilo (medio acuoso)	Hexanoato de etilo (medio acuoso)	Hexanoato de etilo (50% ACN)	Hexanoato de etilo (90% ACN)
OCCALB	61.8 $\pm$ 3.1	-	708.0 $\pm$ 35.4	37.2 $\pm$ 1.9
OCGLXCALB pH 10	68.0 $\pm$ 3.4	-	902.2 $\pm$ 45.1	50.9 $\pm$ 2.5
OCGLXCALB pH 10 (Merc.)	65.8 $\pm$ 3.3	-	626.7 $\pm$ 31.3	46.9 $\pm$ 2.3
GLXCALB	21.0 $\pm$ 1.1	-	100.0 $\pm$ 5.0	12.5 $\pm$ 0.6
OCU	23.7 $\pm$ 1.2*	4.9 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.1*	-
OCGLXLU pH 10	23.4 $\pm$ 1.2*	13.2 $\pm$ 0.7	89.8 $\pm$ 4.5*	-
OCGLXLU pH 10 (Merc.)	20.8 $\pm$ 1.0*	12.5 $\pm$ 0.6	79.0 $\pm$ 4.0*	-
OCRML	22.5 $\pm$ 1.1*	6.7 $\pm$ 0.3	26.2 $\pm$ 1.3**	-
OCGLXRML pH 10	5.9 $\pm$ 0.3*	7.5 $\pm$ 0.4	55.0 $\pm$ 2.8**	-
OCGLXRML pH 10 (Merc.)	4.9 $\pm$ 0.2*	7.3 $\pm$ 0.4	43.0 $\pm$ 2.2**	-
OCTLL	8.6 $\pm$ 0.4*	8.6 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.02**	-
OCGLXTLL pH 10	4.4 $\pm$ 0.2*	10.7 $\pm$ 0.5	19.4 $\pm$ 1.0**	-
OCGLXTLL pH 10 (Merc.)	5.4 $\pm$ 0.3*	11.0 $\pm$ 0.6	23.3 $\pm$ 1.2**	-

La Lecitasa, OC y OCGLX, presentó una actividad similar en la hidrólisis de mandelato de metilo en medio acuoso. Sin embargo, en la hidrólisis de hexanoato de etilo en medio acuoso, OCGLXLecitasa es alrededor de 3 veces más activa

que OCLecitasa y en presencia de 50% acetonitrilo, esta diferencia se convierte en un factor de 64.

En el caso del derivado OCGLXRML, la hidrólisis de mandelato de metilo es 4 veces menos activa que OCRML, pero en la hidrólisis de hexanoato de etilo en medio acuoso OCGLX tiene una actividad similar a OCRML y las diferencias se convierten en un factor de 2 en presencia de 50% acetonitrilo; en concordancia con los resultados obtenidos en la inactivación en presencia de solventes, donde el derivado OCGLX fue 6 veces más estable que su contrapartida OC (**tabla 7**).

El derivado OCTLL es casi 2 veces más activo que OCGLXTLL, en la hidrólisis de mandelato de metilo en medio acuoso, mientras que en la hidrólisis de hexanoato de etilo en medio acuoso es ligeramente menos activa; la presencia de 50% acetonitrilo, en la solución del sustrato hexanoato de etilo, el derivado OCGLXTLL fue casi 100 veces más activo que OCTLL.

A concentraciones de solvente orgánico miscible con el agua mayores al 50% se presentó una fuerte disminución de la actividad enzimática. Esto es debido a que el solvente orgánico reemplaza al agua en la capa superficial de la proteína y distorsiona el estado de hidratación de la molécula en una proporción tal, que la conformación activa catalíticamente en solución no se establece y como consecuencia la enzima se inactiva (Illanes, 1994).

En general, los resultados muestran que en la inmovilización covalente de las lipasas, luego de la activación interfacial sobre los grupos octil, produjo cambios en la especificidad enzimática, quizás no muy significativos comparados con otros cambios reportados en la literatura luego de utilizar diferentes protocolos de inmovilización (Rodrigues y col., 2013; Garcia-Galan y col., 2011; Mateo y col., 2007), pero que poseen un efecto más relevante como lo es la retención de la actividad en presencia de solventes orgánicos, en comparación con la enzima

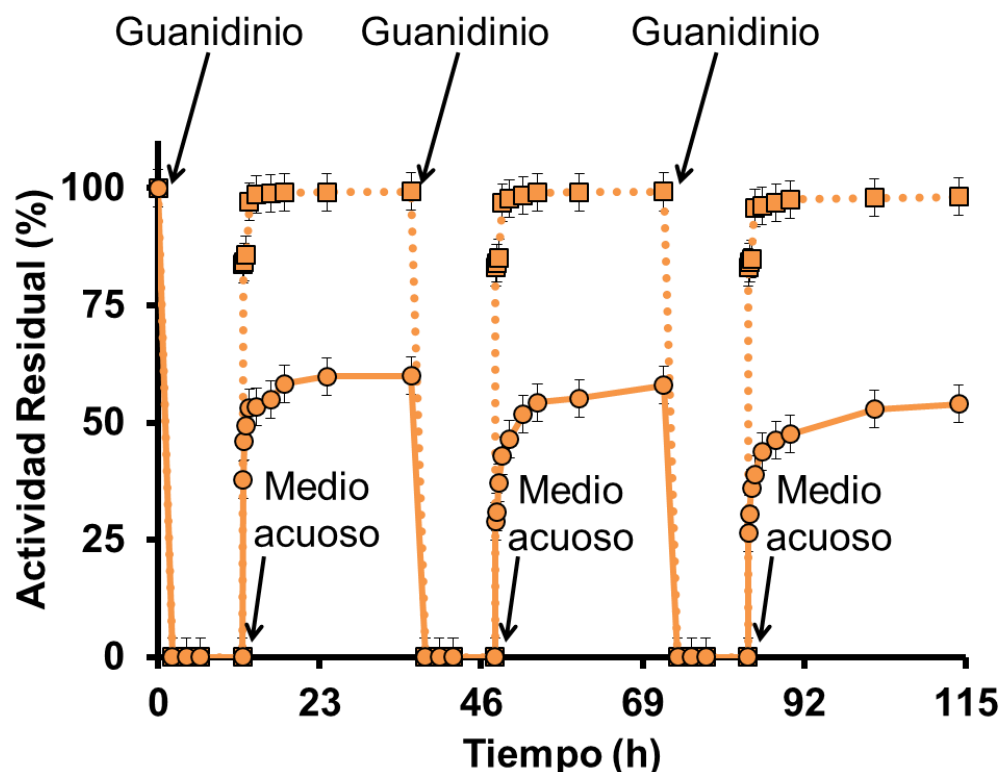
activada interfacialmente sobre octil agarosa que en presencia de altas concentraciones de solventes orgánicos fue desorbida.

3.5.8 Desplegamiento y replegamiento de los derivados de TLL y CALB

Debido a la interacción enzima-soporte mediante interacciones covalentes (uniones irreversibles) de las enzimas inmovilizadas sobre el soporte OCGLX, la inactivación de la enzima sugiere que el biocatalizador y el soporte deben ser descartados. Sin embargo, la irreversibilidad de la unión covalente, hace posible someter la enzima inmovilizada a las estrategias de reactivación (desplegamiento/replegamiento), sin riesgo de la desorción de la enzima, haciendo innecesario el descarte tanto de la enzima como del soporte, aunque exista la posibilidad de interacción de los grupos hidrofóbicos de la enzima con los grupos octil del soporte durante el replegamiento, que puede inhibir la reactivación completa de la enzima. De manera que, los derivados OCGLXCALB, GLXCALB, OCGLXTLL y CNBrTLL fueron sometidos a la técnica de reactivación de proteínas mediante desplegado y replegado (sección 3.3.4).

La **figura 35** muestra que el derivado GLXCALB al ser sometido a tres ciclos de desplegado y replegado recuperó el 100% de la actividad inicial, medida en la hidrólisis de pNPB; además, la reactivación fue muy rápida ya que en 1 hora la enzima recuperó totalmente su actividad inicial. Usando OCGLXCALB, la recuperación no fue tan positiva, ya que se recuperó alrededor del 60% de la actividad inicial en el primer ciclo y alrededor del 55% luego del tercer ciclo.

Figura 35. Ciclos de desplegamiento y replegamiento de los diferentes biocatalizadores de CALB. El desplegamiento se llevó a cabo mediante incubación en guanidinio 9 M y el replegamiento mediante incubación en medio acuoso de buffer fosfato de sodio 100 mM a pH 7. Línea sólida (círculos): OCGLXCALB y Línea punteada (cuadrados): GLXCALB.

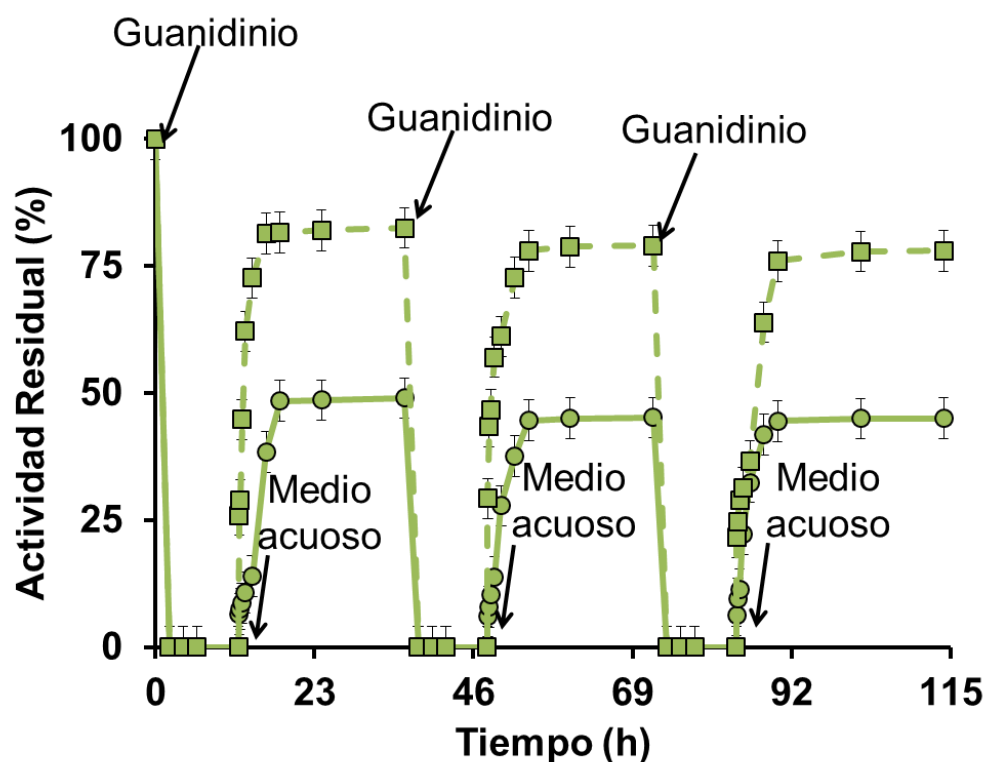


Estos resultados sugieren, que en la naturaleza de inmovilización sobre los soportes GLX, el derivado GLXCALB involucra la unión covalente multipuntual, que proporciona puntos de referencia permitiendo a la enzima replegarse apropiadamente (Mateo y col., 2005; Rodrigues y col., 2009a), y provee una superficie totalmente inerte, que impide cualquier interacción enzima-soporte no deseada que pueda estabilizar diferentes estructuras de la enzima. En el caso de OCGLX, la reactivación fue más lenta y alcanzó solamente un 60% de la actividad

inicial, debido principalmente a la interacción entre las estructuras de la enzima desplegada y los grupos octil del soporte durante el replegamiento.

Debido a la baja estabilidad de TLL a pH 10 (Fernandez-Lafuente, 2010; Rodrigues y col., 2009a), esta enzima no fue inmovilizada sobre GLX, por lo tanto el soporte CNBr fue usado como referencia estándar de inmovilización mediante interacciones covalentes enzima-soporte. El derivado CNBrTLL, recuperó alrededor del 82% de la actividad enzimática (ciclo 1) (**figura 36**) y en el tercer ciclo, la reactivación alcanzó el 78% de la actividad inicial, valor muy similar al obtenido en el primer ciclo. Un bajo porcentaje de actividad enzimática inicial fue recuperado para OCGLXTLL, los tres ciclos oscilan entre el 45 y 48%; además, la reactivación fue más lenta que la obtenida usando CNBrTLL. Estos resultados sugieren que el replegamiento de TLL puede ser más complejo que el de CALB, en concordancia con reportes previos, en los cuales la adición de algunos detergentes mejora la reactivación (Rodrigues y col., 2009a).

Figura 36. Ciclos de desplegamiento y replegamiento de los diferentes biocatalizadores de TLL. El desplegamiento se llevó a cabo mediante incubación en guanidinio 9 M y el replegamiento mediante incubación en medio acuoso de buffer fosfato de sodio 100 mM a pH 7. Línea sólida (círculos): OCGLXTLL y Línea punteada (cuadrados): CNBrTLL.



3.5.9 Reactivación de CALB y TLL inmovilizadas

Se estudió la posibilidad de usar la estrategia de desplegamiento y replegamiento para reactivar una enzima inactivada previamente, mediante la acción de solventes orgánicos; además, los resultados fueron comparados con los obtenidos luego de desplegar y replegar la enzima inmovilizada inalterada (sección 3.5.8). Los derivados de CALB y TLL fueron inactivados en presencia de 90%

dimetilformamida y 80% 1,4-dioxano, respectivamente, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.3.5.2.

La **figura 37** muestra que luego de la inactivación en presencia de 90% (v/v) DMF, la reactivación de GLXCALB permitió recobrar el 95% de la actividad enzimática en el primer ciclo y 90% en el tercero; además, la reactivación fue más lenta que la mostrada en la figura 35. Los resultados usando OCGLXCALB fueron similares, aunque en este caso, la reactivación solamente alcanzó el 50% en el primer ciclo y el 45% en el tercero, comparado con el 60% observado usando la enzima inalterada. En adición, la vida operacional de la enzima inmovilizada en OCGLX incrementó, pero esto puede ser debido en parte a su inmovilización irreversible sobre este soporte.

La reactivación de CNBrTLL permitió obtener valores similares de actividad luego de la inactivación de la enzima en presencia de 80%(v/v) dioxano (**figura 38**) a los obtenidos con la enzima inalterada (**figura 36**). Alrededor del 80% de la actividad enzimática fue recuperada durante tres ciclos sucesivos de inactivación y reactivación. Sin embargo, los resultados de OCGLXTLL (**figura 38**), difieren de los obtenidos y visualizados previamente en la figura 36. La reactivación recuperada fue de solamente el 40% de la actividad inicial, valor que se mantuvo durante los ciclos siguientes.

Figura 37. Ciclos de inactivación, desplegamiento y replegamiento de los diferentes derivados de CALB. La inactivación se llevó a cabo en 90% de DMF, seguido de su replegamiento mediante incubación en guanidinio 9 M y finalmente su replegamiento en medio acuoso de buffer fosfato de sodio 100 mM a pH 7 y 25°C. Línea sólida (círculos): OCGLCALB y Línea punteada (cuadrados): GLXCALB.

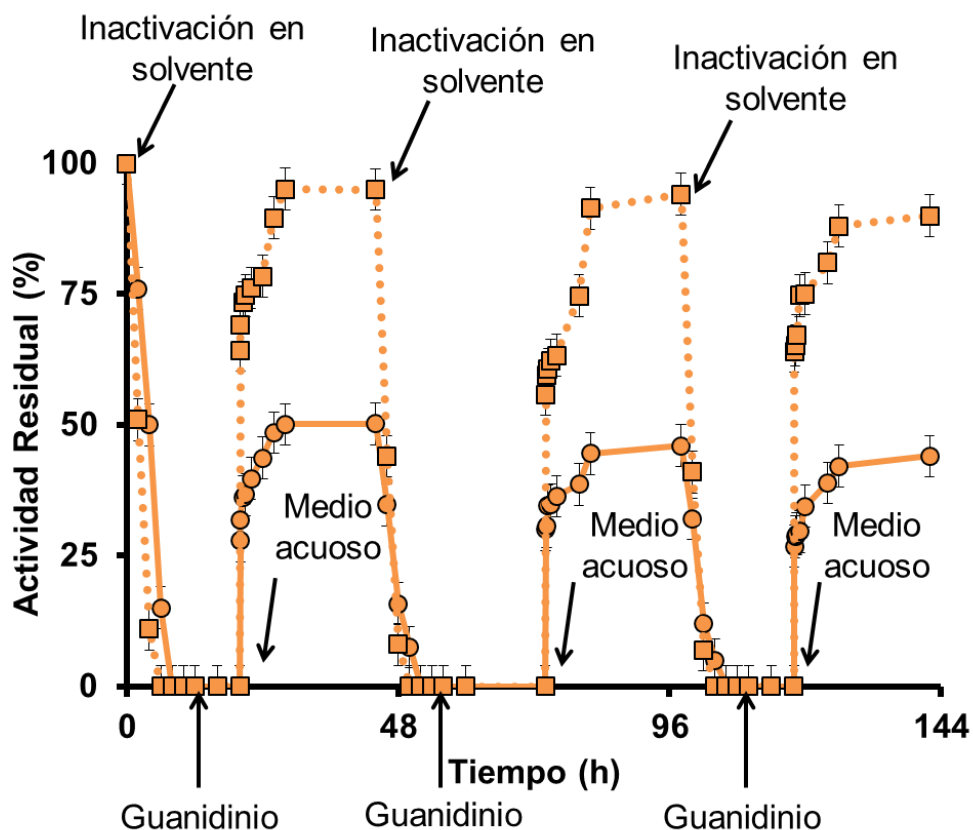
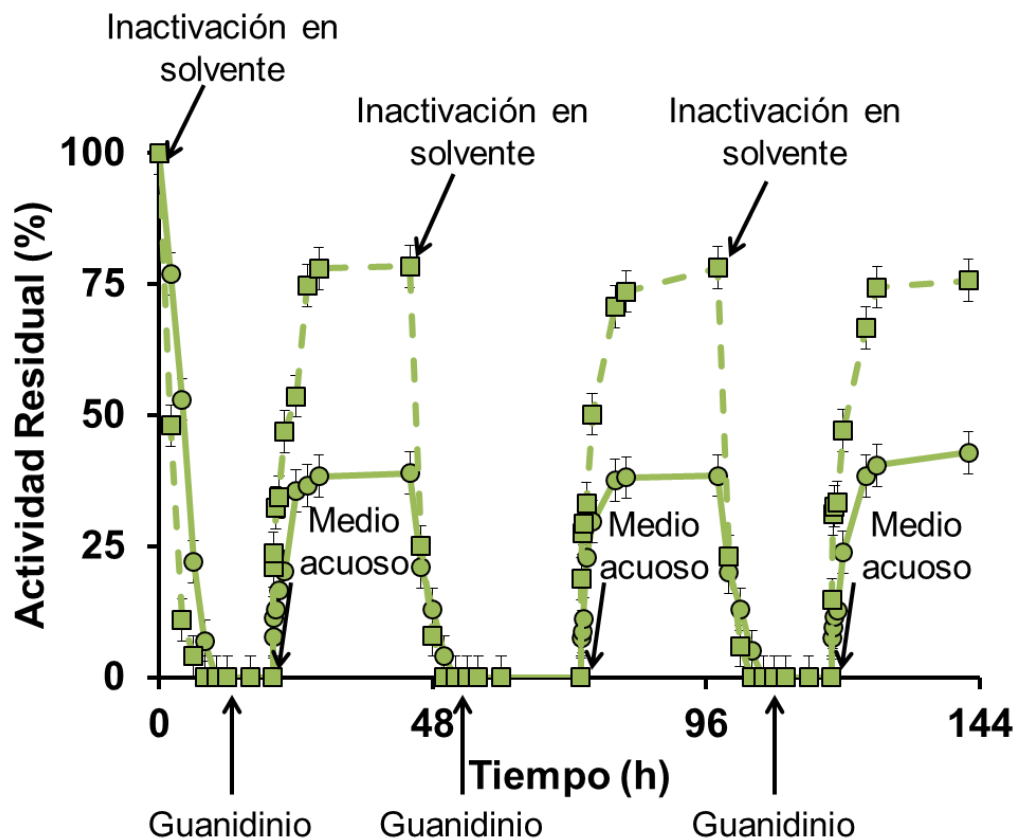


Figura 38. Ciclos de inactivación, desplegamiento y replegamiento de los diferentes derivados de TLL. La inactivación se llevó a cabo en 80% de Dioxano, seguido de su replegamiento mediante incubación en guanidinio 9 M y finalmente su replegamiento en medio acuoso de buffer fosfato de sodio 100 mM a pH 7 y 25°C. Línea sólida (círculos): OCGLXTLL y Línea punteada (cuadrados): CNBrTLL.



Los resultados obtenidos en la comparación de las enzimas inmovilizadas inalteradas con las inactivadas en presencia de solventes orgánicos no fueron idénticos, con excepción de CNBrTLL. La explicación probable, para GLXCALB, es que no se logró desplegar completamente la enzima debido a la inmovilización covalente multipuntual sobre este soporte, incluso en guanidinio 9 M, por lo cual las estructuras adoptadas por la enzima cuando inició el replegamiento no fueron

idénticas y generó cambios en las estructuras finales. La presencia de los grupos octil de cadena larga (comparada con el grupo glioxil) y la fijación de la enzima mediante brazos espaciadores muy cortos, podría tener factores adicionales en los pasos de reactivación de desplegamiento y replegamiento. Al contrario, una explicación probable para los buenos resultados obtenidos con CNBrTLL es el sistema de unión de este soporte, ya que genera muy pocos puntos de interacción enzima-soporte (posiblemente solo uno) y por lo tanto, el proceso de desplegamiento/replegamiento es menos obstaculizado por la interacción con el soporte.

3.5.10 Evaluación de las diferentes enzimas inmovilizadas en la hidrólisis de R y S mandelato de metilo

La estrategia propuesta para el desplegamiento y replegamiento de las enzimas inmovilizadas mediante interacciones covalentes ha sido útil, pero persisten algunas inquietudes sobre la forma real de la estructura de la enzima reactivada y si esta forma se puede obtener a través de una serie de ciclos de reactivación. El éster p-NPB es fácilmente hidrolizable y en muchas publicaciones ha sido considerado como el único sustrato. Por tanto, las enzimas inmovilizadas, luego de los diferentes tratamientos, fueron evaluadas en la hidrólisis de un sustrato más complejo, los isómeros R y S del compuesto quiral mandelato de metilo. Los resultados se pueden observar en la **tabla 9**.

Tabla 9. Actividad de los diferentes biocatalizadores en la hidrólisis de *R* y *S* mandelato de metilo (50 mM) a pH 7 y 25°C. Los experimentos fueron realizados como se describió previamente. La actividad (*V*) está dada en μ moles de sustrato hidrolizado por min y por mg de enzima inmovilizada. ^aBiocatalizadores sometidos a desplegamiento/replegamiento por el número de ciclos indicados. ^bBiocatalizadores sometidos a inactivación mediante incubación en solvente (90% DMF para CALB, 80% dioxano para TLL) y a desplegamiento/replegamiento por el número de ciclos indicados.

BIOCATALIZADOR	<i>V</i>_{R-mandelato de metilo}	<i>V</i>_{S-mandelato de metilo}	<i>V</i>_R / <i>V</i>_S
OCGLXCALB	83 ± 4.2	42 ± 2.1	2.0
OCGLXCALB ^a Ciclo 1	57 ± 2.9	21.1 ± 1.1	2.7
OCGLXCALB ^a Ciclo 3	51.2 ± 2.7	19.7 ± 1	2.6
OCGLXCALB ^b Ciclo 1	53 ± 2.7	23 ± 1.2	2.3
OCGLXCALB ^b Ciclo 3	49.3 ± 2.5	20 ± 1	2.5
GLXCALB	23.7 ± 1.2	11.3 ± 0.6	2.1
GLXCALB ^a Ciclo 1	19.1 ± 1	7.6 ± 0.4	2.5
GLXCALB ^a Ciclo 3	17.2 ± 0.9	7.1 ± 0.4	2.4
GLXCALB ^b Ciclo 1	17.1 ± 0.9	7.6 ± 0.4	2.3
GLXCALB ^b Ciclo 3	16.3 ± 0.7	7.2 ± 0.4	2.3
OCGLXTLL	0.034 ± 0.002	0.031 ± 0.002	1.1
OCGLXTLL ^a Ciclo 1	0.017 ± 0.001	0.011 ± 0.001	1.5
OCGLXTLL ^a Ciclo 3	0.011 ± 0.001	0.009 ± 0.001	1.2
OCGLXTLL ^b Ciclo 1	0.019 ± 0.002	0.012 ± 0.001	1.6
OCGLXTLL ^b Ciclo 3	0.018 ± 0.002	0.010 ± 0.001	1.8
CNBrTLL	0.0088 ± 0.0002	0.0058 ± 0.0002	1.5
CNBrTLL ^a Ciclo 1	0.0047 ± 0.0001	0.0031 ± 0.0001	1.5
CNBrTLL ^a Ciclo 3	0.0046 ± 0.0001	0.0031 ± 0.0001	1.5
CNBrTLL ^b Ciclo 1	0.0045 ± 0.0001	0.0032 ± 0.0001	1.4
CNBrTLL ^b Ciclo 3	0.0041 ± 0.0001	0.0028 ± 0.0001	1.5

El porcentaje de actividad recuperada usando sustratos más complejos fue menor que la obtenida usando p-NPB, la cual también disminuye entre los ciclos 1 y 3 de desplegamiento/replegamiento, sugiriendo que la estructura de la enzima obtenida en cada ciclo de reactivación puede diferir de la obtenida en el ciclo previo.

La actividad del derivado OCGLXCALB disminuyó en la hidrólisis de *R*-mandelato de metilo alrededor de un 70% en el primer ciclo y un 60% en el tercero; además, la inactivación del derivado mediante incubación en 90% DMF no alteró significativamente el resultado. Para GLXCALB, a diferencia de con p-NPB, una disminución de la actividad inicial hasta el 80% se hace más evidente en el primer ciclo, luego del tercer ciclo, solamente se recuperó un 70% de la actividad inicial. La actividad del OCGLXTLL disminuyó hasta un 50% en el primer ciclo de desplegamiento/replegamiento y un valor similar fue obtenido cuando la enzima fue inactivada por primera vez en presencia de dioxano; luego de tres ciclos, la actividad fue recuperada ligeramente en ambos casos. Por otro lado, los derivados CNBrTLL presentaron un comportamiento muy similar.

Usando CALB, la disminución en la actividad enzimática fue más alta en el isómero *S*, lo cual generó un incremento en la enantioespecificidad de CALB luego de emplear la estrategia de reactivación. OCGLXCALB incrementó su radio de velocidad de hidrólisis entre los isómeros *R*- y *S*- de 2 a un máximo de 2.7. En consecuencia, podría esperarse que la recuperación parcial de la estructura de la enzima tenga un mayor impacto en su actividad frente a sustratos más complejos.

Los resultados concuerdan con los valores obtenidos en el desplegamiento / replegamiento de las enzimas inalteradas y no inactivadas, e indica que esta estrategia puede ser útil en la reactivación de enzimas, obteniendo buenos niveles de recuperación de actividad usando sustratos simples; sin embargo, si las

enzimas se miden con sustratos más complejos, la diferencia de actividad entre la enzima inalterada y la alterada será amplia, ya que no se consigue que la enzima replegada sea idéntica a la inicial.

3.6 CONCLUSIONES

El nuevo soporte octil-glioxil (OCGLX) agarosa, preparado a partir del soporte comercial octil-agarosa, mostró un gran potencial para ser usado en la inmovilización de lipasas, permitiendo una primera inmovilización vía activación interfacial y, en segunda instancia, la inmovilización mediante uniones covalentes enzima-soporte; generando derivados con una alta actividad, alta estabilidad térmica y en presencia de solventes orgánicos.

En general, un alto porcentaje de moléculas de lipasa adsorbidas interfacialmente fueron enlazadas covalentemente al soporte OCGLX (con excepción de TLL). Lo cual generó un alto rendimiento de inmovilización covalente de las enzimas sobre el soporte. Sin embargo, los residuos aldehído están bajo una capa de grupos octil largos que dificultarían la interacción covalente enzima-soporte y sumado a ello, las lipasas generalmente no son muy ricas en residuos Lys dificultando aún más este tipo de interacción. En este sentido, un enriquecimiento (químico o genético) de la superficie de la enzima con nuevos grupos amino parece una alternativa conveniente para obtener una inmovilización covalente multipuntual de algunas enzimas sobre el soporte OCGLX.

Los resultados indican que no es simple recuperar la estructura inicial de una enzima, o al menos una estructura idéntica luego de cada ciclo de reactivación, lo cual podría ser un problema si la enzima es usada en reacciones en donde esta sea quien determine la velocidad de reacción o la calidad del producto (ej., en la resolución de mezclas racémicas).

Es muy probable que las preparaciones OCGLX puedan generar problemas en el replegamiento, por ejemplo interacciones con los grupos octil, problemas estéricos en el movimiento de la cadena proteica generados por el soporte y la proximidad de otras moléculas enzimáticas desplegadas que puedan causar interacciones no deseadas. Sin embargo, también es claro que la actividad de la enzima puede ser completamente destruida mediante distorsiones de la enzima causadas por la incubación en solventes y desplegamiento por incubación en guanidinio, y un alto porcentaje de esta actividad es recuperada luego de ser replegada en un medio acuoso.

4. AMINACIÓN QUÍMICA E INCUBACIÓN EN PRESENCIA DE SALES DE LIPASAS INMOVILIZADAS SOBRE EL SOPORTE OCGLX AGAROSA

4.1 INTRODUCCIÓN

Entre las enzimas más usadas en biocatálisis se encuentran las lipasas, que al igual que otras enzimas, requieren ser inmovilizadas antes de ser empleadas en la industria como biocatalizadores (Sheldon y van Pelt., 2013; Cantone y col., 2013; DiCosimo y col., 2013). La adsorción específica de las lipasas sobre soportes hidrofóbicos mediante activación interfacial es la metodología más apropiada para cumplir con este objetivo (Manoel y col., 2015; Bastida y col., 1998).

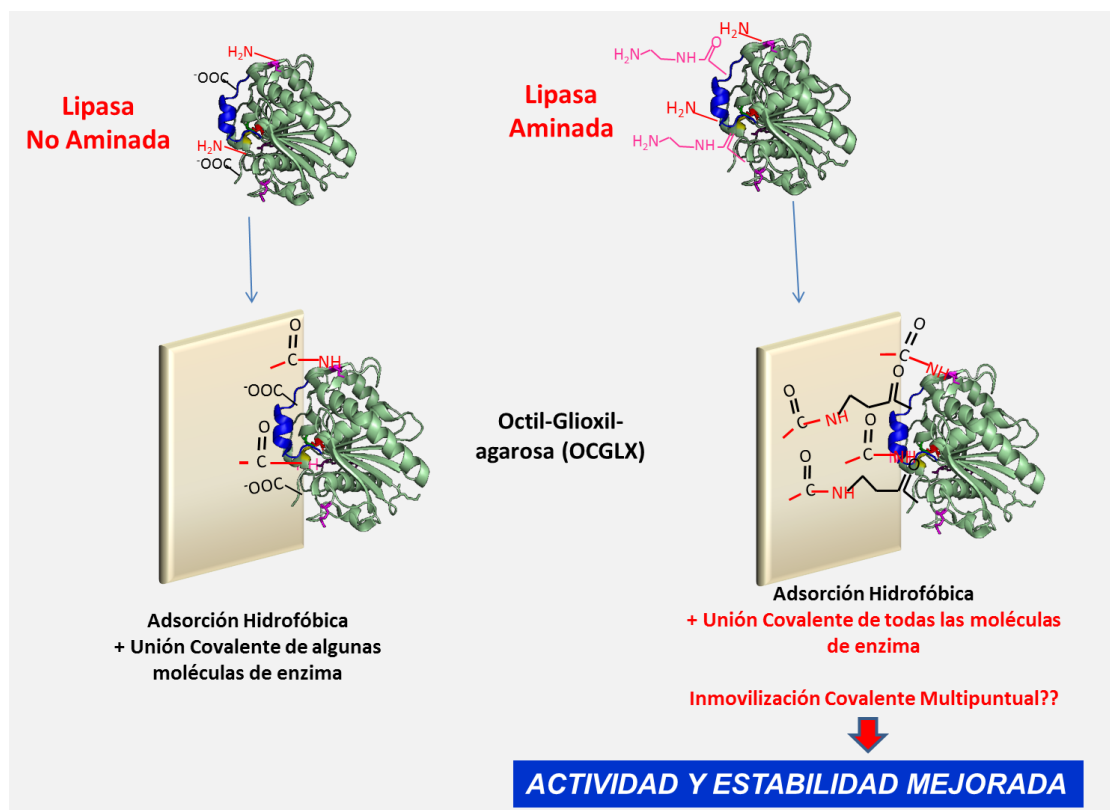
El uso del soporte octil-glioxil agarosa (OCGLX) se ha propuesto como una metodología que permite solucionar algunas de las limitaciones del soporte octil agarosa (OC), como la desorción o liberación indeseada de la enzima al medio bajo ciertas condiciones (Suescun y col., 2015; Rueda y col., 2015 y 2016). Este soporte heterofuncional, mediante dos etapas de inmovilización, permite obtener las ventajas del OC (inmovilización selectiva de la forma abierta de la lipasa en la primera etapa) y la unión irreversible lograda por la interacción covalente entre los grupos glioxil del soporte y los grupos amino primarios de la enzima, que usualmente permiten mejorar la estabilidad de las lipasas (en la segunda etapa) (Suescun y col., 2015; Rueda y col., 2015). Además, las lipasas inmovilizadas sobre este soporte pueden ser sometidas a estrategias de reactivación mediante protocolos de desplegamiento/replegamiento sin la liberación de la enzima (Suescun y col., 2015; Rueda y col., 2015).

Debido a la inestabilidad de algunas lipasas en valores de pH alcalinos, el protocolo de inmovilización sobre el soporte OCGLX que incluye la incubación de la enzima a pH 10 (en la segunda etapa de inmovilización) (Rueda y col., 2015),

genera la pérdida de actividad e incluso la inactivación de las enzimas. Además, debido al bajo número de Lys de las enzimas adsorbidas mediante este protocolo, pueden ser liberadas al medio de reacción en presencia de detergentes, debido a que las moléculas de enzima no son capaces de establecer suficientes interacciones covalentes con el soporte (Suescun y col., 2015; Rueda y col., 2015).

Por lo anterior, es necesario desarrollar métodos que permitan estabilizar las lipasas a valores de pH alcalinos y que mejore significativamente el desempeño de estas enzimas inmovilizadas sobre el soporte octil-glioxil agarosa. Por lo tanto, en este estudio, se utilizó la modificación química en fase sólida de las lipasas CALB, RML y TLL para mejorar su compatibilidad química con el soporte OCGLX e incrementar las uniones covalentes multipuntuales (**Figura 39**). Recientemente se describió que algunos cationes (Ca^{2+} y Mn^{2+}) son capaces de estabilizar algunas lipasas inmovilizadas sobre el soporte Octil agarosa (Fernandez-Lopez y col., 2015); por lo cual, además de la modificación química, se evaluó si la presencia de cationes podría mejorar la estabilidad operacional de los biocatalizadores de algunas lipasas inmovilizadas sobre el soporte heterofuncional.

Figura 39. Estrategia de inmovilización de lipasas aminadas y no-aminadas sobre el soporte OCGLX agarosa.



4.2 MATERIALES

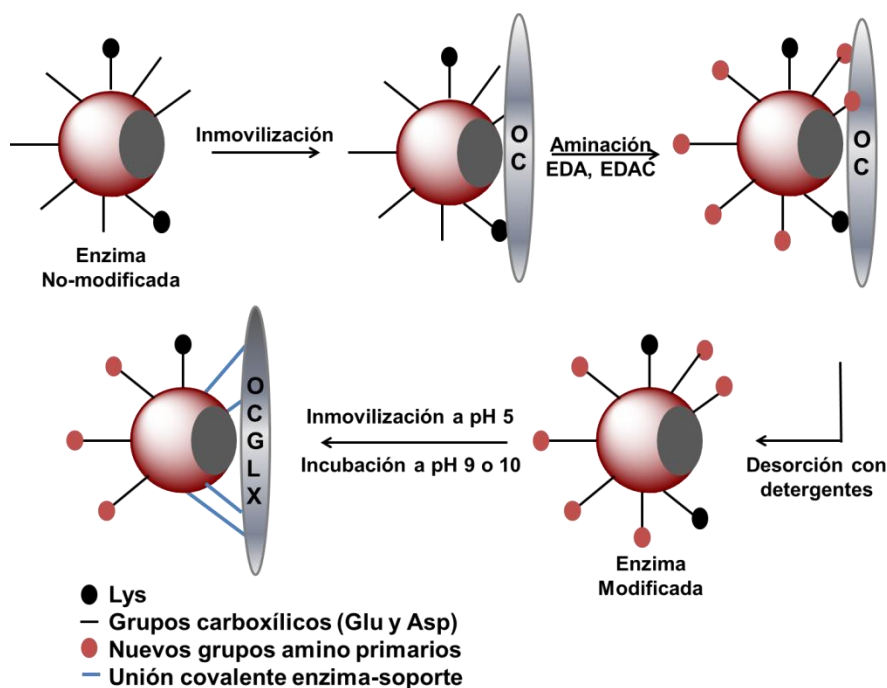
La lipasa B de *Candida antarctica* (CALB), lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) y lipasa de *Rhizomucor miehei* (RML) fueron obtenidas de Novozymes (España). El soporte Octil agarosa 4BCL fue obtenido de GE Healthcare. El etilhexanoato, etilendiamina (EDA), N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida (EDAC), ácido picrilsulfónico, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), Tritón X-100, la lipasas de *Candida rugosa* (CRL) y p-nitrofenilbutirato (p-NPB) fueron obtenidos de Sigma Aldrich. Todos los solventes y reactivos utilizados fueron de grado analítico.

4.3 MÉTODOS EXPERIMENTALES

El esquema de la metodología general propuesta, se presenta en la **figura 40**. Inicialmente, las lipasas CALB, TLL y RML fueron inmovilizadas por adsorción interfacial sobre el soporte octil agarosa para su posterior modificación química en fase sólida. Una vez obtenidos los derivados modificados, las lipasas aminadas fueron desorbidas del soporte mediante el uso de detergentes y finalmente inmovilizadas sobre los soportes OC, OCGLX y GLX. El efecto de la modificación química sobre las propiedades bioquímicas de los derivados fue evaluado.

Posteriormente, se evaluó el efecto estabilizante en presencia de cationes divalentes como Ca^{2+} y Mn^{2+} sobre los biocatalizadores de RML inmovilizada sobre OC y OCGLX a pH 10.

Figura 40. Metodología general para el estudio del efecto de la modificación química en fase sólida.



La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), usando como referencia albúmina de suero bovino. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se presentan como la media de este valor con una desviación estándar, usualmente, menor al 10%.

4.3.1 Preparación de soportes glioxil (GLX y OCGLX)

La preparación de los soportes glioxil, a partir de agarosa 4BCL (activado con 30 μmol de aldehídos por g de soporte húmedo) y octil agarosa 4BCL (activado con 25 μmol de aldehídos por g de soporte húmedo), se llevó a cabo mediante la oxidación directa de los dioles presentes en cada soporte usando una cantidad estequiométrica de periodato de sodio, como se ha descrito en el protocolo estándar (Rueda y col., 2015; Guisán, 1988).

4.3.2 Inmovilización de enzimas sobre los soportes octil (OC), octil-glioxil (OCGLX) o glioxil (GLX)

La inmovilización de las lipasas sobre los soportes se llevó a cabo usando 1 mg (para inactivaciones y actividad con pNPB) o 10 mg (para SDS-PAGE, aminación química y actividad con hexanoato de etilo) de proteína por gramo de soporte.

4.3.2.1 Inmovilización de enzimas sobre los soportes octil (OC) y octil-glioxil (OCGLX) agarosa

Las muestras comerciales de enzimas fueron diluidas en 100 mL de buffer 5 mM de acetato de sodio a pH 5 o fosfato de sodio a pH 7. Seguidamente, 10 g del soporte deseado fueron adicionados en la solución enzimática bajo agitación

suave y 25°C. Periódicamente, se tomaron muestras de suspensión y sobrenadante y se determinó la actividad enzimática usando p-NPB (sección 4.4.1). Luego de la inmovilización la suspensión fue filtrada y la enzima soportada fue lavada varias veces con agua destilada.

En el caso de OCGLX, las enzimas inmovilizadas fueron resuspendidas en buffer bicarbonato de sodio 50 mM a pH 9 ó pH 10 por diferentes tiempos, para favorecer la reacción covalente enzima-soporte (Mateo y col., 2005; Rueda y col., 2015). Periódicamente, se tomaron muestras de suspensión a diferentes tiempos y su actividad fue determinada usando p-NPB.

Para el estudio del efecto de los cationes, las lipasas inmovilizadas sobre OCGLX fueron resuspendidas en una solución de glicina 2.5 mM (en algunos casos conteniendo 5 mM de CaCl_2) o 25 mM de buffer bicarbonato de sodio a pH 10 y 25°C

4.3.2.2 Inmovilización de enzimas sobre el soporte glioxil (GLX) agarosa

Las muestras comerciales de enzimas fueron diluidas en 100 mL de buffer bicarbonato de sodio 50 mM a pH 9 o pH 10. Luego, 10 gramos de soporte fueron suspendidos en la solución enzimática bajo agitación suave y 25°C. Periódicamente, se tomaron muestras de sobrenadante y suspensión y su actividad enzimática fue determinada.

4.3.2.3 Reducción con borohidruro de sodio

Para finalizar la reacción covalente enzima-soporte, borohidruro de sodio sólido fue adicionado a una concentración de 1 mg/mL a las suspensiones de OCGLX y GLX (a pH 9 o 10) y fueron sometidas a agitación suave durante 30 minutos. Este tratamiento reduce las bases de Schiff reversibles a enlaces aminos secundarios

muy estables y los grupos aldehído sin reaccionar a grupos hidroxilo inertes (Guisán, 1988; Mateo y col., 2006; Mateo y col., 2005; Rodrigues y col., 2011). Finalmente, los derivados reducidos fueron filtrados, lavados con abundante agua destilada y almacenados a 4°C.

4.3.3 Desorción de las enzimas de los soportes

Para analizar si las enzimas fueron inmovilizadas mediante uniones covalentes al soporte, los derivados reducidos OCGLX fueron incubados con una concentración creciente del detergente apropiado para cada lipasa, usando como referencia los derivados OC. Este tratamiento solamente libera las moléculas de enzima adsorbidas mediante activación interfacial.

Para ello, 1 g de cada biocatalizador fue suspendido en 10 mL de buffer 10 mM de acetato de sodio a pH 5 o fosfato de sodio a pH 7 y 25°C. Luego, Tritón X-100 (para CALB y RML) o CTAB (para TLL) fue adicionado progresivamente hasta alcanzar una concentración final de 1.5% o 2% (v/v), respectivamente. Cada adición se realizó a intervalos de 30 minutos, tiempo durante el cual se extrajeron muestras de suspensión y sobrenadante para determinar el porcentaje de enzima liberada (mediante la hidrólisis de p-NPB, sección 4.4.1) y realizar una nueva adición de detergente. Una suspensión de referencia, teniendo soporte inerte y la misma cantidad de lipasa fue sometida exactamente al mismo tratamiento, para detectar los efectos del detergente sobre la actividad o estabilidad enzimática.

4.3.4 Modificación química de las lipasas inmovilizadas sobre el soporte octil-agarosa

Un gramo de derivado OC-lipasa (10 mg/g soporte), fue adicionado a 10 mL de etilendiamina 1 M a pH 4.7-4.8 manteniendo agitación continua. La modificación inició con la adición de EDAC a una concentración final de 10 mM, para obtener

una modificación del 100% de los grupos ácido carboxílico superficiales (Barbosa y col., 2012; Fernandez-Lorente y col., 2008). Luego de 90 minutos de agitación suave a 25°C, los derivados aminados fueron filtrados y lavados con agua destilada. Seguidamente, las preparaciones aminadas fueron resuspendidas durante 24 h en hidroxilamina 1 M a pH 8, para recuperar las tirosinas modificadas (Carraway y Koshland, 1968). Finalmente, los biocatalizadores fueron filtrados y lavados con buffer fosfato de sodio a pH 7 y agua destilada. Las actividades recuperadas luego de esta modificación química, fueron medidas utilizando p-NPB.

Para obtener las lipasas aminadas solubles (CALB-A, RML-A y TLL-A), 1 gramo de la lipasa adsorbida y modificada fue resuspendida en 10 mL del detergente apropiado para cada enzima: Tritón X-100 para CALB-A (1%, v/v) y RML-A (0.7%, (v/v), y CTAB para TLL-A (0.7%, p/v).

Las soluciones enzimáticas obtenidas previamente, fueron diluidas 10 veces para disminuir la cantidad de detergente y evitar problemas en la adsorción de la enzima aminada sobre los soportes. Las enzimas no-aminadas fueron sometidas al mismo tratamiento para evitar posibles diferencias.

4.3.5 Aminación química e inmovilización covalente de las lipasas inmovilizadas sobre OCGLX

Las enzimas nativas (muestras comerciales) fueron inmovilizadas directamente sobre OCGLX y sometidas al proceso de aminación descrito previamente (sección 4.3.4.). Luego, fueron incubadas a pH 10 para obtener la interacción covalente enzima-soporte, siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.3.2.

4.3.6 Inactivación térmica de las diferentes preparaciones enzimáticas

1 gramo de derivado fue suspendido en 10 mL de buffer 50 mM de acetato de sodio a pH 5, fosfato de sodio a pH 7, bicarbonato de sodio a pH 9 o 5 mM de acetato de sodio a pH 5 (en algunos casos, conteniendo 5 mM de CaCl_2 o MnCl_2) a diferentes temperaturas. Periódicamente, se extrajeron muestras de suspensión y su actividad fue medida usando p-NPB (sección 4.4.1). La vida media fue calculada de las cinéticas de inactivación observadas.

4.3.7 Inactivación de los diferentes biocatalizadores en presencia de solventes orgánicos

1 gramo de derivado fue incubado en 10 mL de una mezcla de acetonitrilo (ACN) o 1,4-dioxano / TrisHCl 100 mM a pH 7 y 30°C. Periódicamente, se tomaron muestras de suspensión y su actividad fue medida usando p-NPB (sección 4.4.1). La vida media fue calculada de las cinéticas de inactivación observadas. Los co-solventes orgánicos presentes en las muestras no tuvieron un efecto significativo sobre la actividad enzimática.

En algunas instancias, los derivados fueron suspendidos en una mezcla de 25% ACN en buffer TrisHCl 5mM a pH 7 y 30°C, conteniendo o no 5 mM de CaCl_2 o MnCl_2 .

4.3.8 Determinación de la solubilidad de CaCl_2 o MnCl_2 a pH 10 en diferentes buffers

La solubilidad de las sales de CaCl_2 o MnCl_2 5 mM fue determinada en buffer de bicarbonato de sodio, borato de sodio, glicina/NaOH, fosfato de sodio y Tris a diferentes concentraciones (2.5-50 mM) a pH 10 y 25°C. Luego de 30 minutos, en algunos casos, se observó la existencia de precipitado.

4.3.9 Determinación de la actividad hidrolítica de los biocatalizadores frente a hexanoato de etilo

La actividad enzimática de los derivados obtenidos fue evaluada en la hidrólisis de hexanoato de etilo; 200 mg de las enzimas inmovilizadas fueron adicionadas a 1 mL de una solución 25 mM de sustrato (preparada en buffer fosfato de sodio 50 mM a pH 7), en algunos casos conteniendo ACN para obtener un sistema homogéneo en lugar de un sistema bifásico. Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo agitación constante a 25 °C. Periódicamente, el progreso de la reacción fue monitoreado extrayendo a diferentes tiempos alícuotas del medio de reacción para analizar los productos formados y el sustrato consumido a través de HPLC en fase reversa, de acuerdo con lo descrito en la sección 4.4.2, hasta obtener conversiones entre el 20 – 30%.

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.4.1 Determinación estándar de la actividad enzimática frente al p-NPB

Este ensayo se llevó a cabo midiendo el incremento de absorbancia a 348 nm (punto isosbético), producido por la formación del producto p-nitrofenol en la hidrólisis de p-NPB 0.4 mM (disuelto en buffer fosfato de sodio 100 mM) a pH 7 y 25 °C ($\epsilon = 5150 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ bajo estas condiciones). Para iniciar la reacción, 50 – 100 μL de muestra se agregaron a 2.5 mL de la solución del sustrato. Una unidad de actividad enzimática (U) fue definida como la cantidad de enzima que es necesaria para hidrolizar 1 μmol de p-NPB por minuto bajo las condiciones descritas previamente.

4.4.2 Determinación de la actividad hidrolítica de los biocatalizadores frente a hexanoato de etilo

El grado de conversión se analizó mediante HPLC en fase reversa (Spectra Physic SP 100) acoplado a un detector UV (Spectra Physic SP 8450) y utilizando una columna Kromasil C18 (15 cm x 0.46 cm) suministrada por Análisis Vínicos (España). Las muestras (20 μ L) fueron eluidas en una fase móvil de acetonitrilo y acetato de amonio 10 mM a pH 3.2 (en proporción 50:50, v/v) y a un flujo de 1.0 mL/min. La longitud de onda empleada en el análisis fue de 208 nm. Cuando se presentó un sistema bifásico, una muestra de 100 μ L fue extraída bajo agitación fuerte, mezclada con un volumen de ACN y filtrada antes de ser inyectada. El ácido hexanoico tuvo un tiempo de retención de 3.4 min y el éster un tiempo de retención de 14.2 min. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μ mol de ácido por minuto bajo las condiciones descritas. La actividad fue determinada por triplicado con un máximo de conversión del 20 – 30%, los resultados se presentan como la media de este valor.

4.4.3 Análisis mediante SDS-PAGE

El análisis en geles de poliacrilamida se llevó a cabo de acuerdo con la metodología propuesta por Laemmli (1970), usando el sistema de electroforesis Mini-PROTEAN® (Bio-rad). 100 mg del respectivo derivado enzimático fueron re-suspendidos en 1 mL de buffer de ruptura (2% SDS y 10% mercaptoetanol) y calentadas hasta ebullición durante 5 minutos. Una alícuota de 20 μ L del sobrenadante fue usada en los experimentos y posteriormente analizada usando geles de corrido al 12 %(p/v), en una zona de separación de 9 cm x 6 cm. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente y 150 mV de voltaje constante durante 90 min. El revelado de las proteínas se realizó mediante tinción con azul

brillante de Coomassie R-250. Los marcadores de peso molecular (comprendidos entre 10 y 200 kDa) usados fueron de Fermentas.

4.4.4 Estudio bioinformático de accesibilidad de los solventes a los aminoácidos de CALB susceptibles a modificación química

Se realizó el estudio teórico de la accesibilidad de los agentes modificantes a los aminoácidos superficiales de las enzimas. Además, las estructuras 3D de las diferentes lipasas fueron tomadas de Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>) y modeladas usando el software de visualización Pymol, versión 0.99. Los valores de accesibilidad de superficie (ASA) para los residuos aminoacídicos fueron calculados mediante el programa ASA-view de libre acceso web (<http://www.abren.net/asaview/>) (Shandar y col., 2004).

4.5 RESULTADOS

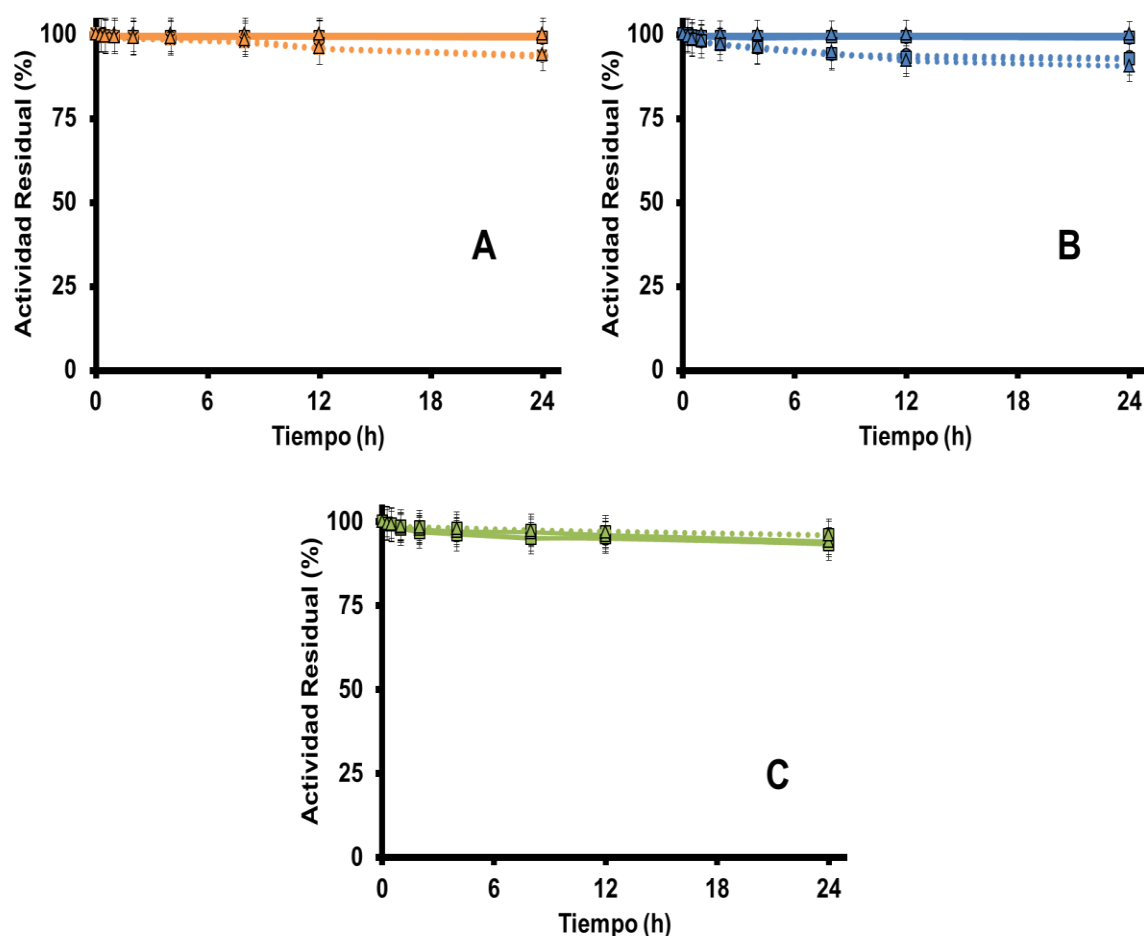
4.5.1 Inmovilización de las lipasas sobre los soportes GLX

En primer lugar, fue necesario encontrar condiciones donde la primera inmovilización de las enzimas sobre OCGLX se llevara a cabo mediante activación interfacial sobre la capa de grupos octil y no por los grupos glioxil (Rueda y col., 2015). Debido a que las enzimas aminadas tienen una actividad mayor que las proteínas nativas (Rodrigues y col., 2009; Fernandez-Lorente y col., 2008), fue necesario disminuir el pH de inmovilización (pH 5), en comparación con el usado previamente para las enzimas nativas (pH 7) (Rueda y col., 2015).

A pH 5, las lipasas de CALB, RML y TLL aminadas o no modificadas, no fueron inmovilizadas sobre el soporte GLX (**Figura 41**). Por lo cual, este valor de pH fue el apropiado para inmovilizar las enzimas mediante activación interfacial sobre el soporte OCGLX. Lo anterior concuerda con los resultados esperados, ya que para

inmovilizar enzimas sobre un soporte GLX se necesita establecer enlaces amino-glioxil (Mateo y col., 2005) por tanto, las enzimas aminadas (con nuevos grupos amino de pK 9.2) (Fernandez-Lafuente y col., 1993) deben tener algunos grupos amino no-ionizados a pH 5.

Figura 41. Cinética de inmovilización de las diferentes lipasas sobre el soporte glioxil agarosa a pH 5. Panel A: CALB, Panel B: RML, Panel C: TLL. Línea sólida: lipasas aminadas, Línea punteada: lipasas no-aminadas. Círculos: suspensión, cuadrados: sobrenadante, triángulos: enzima soluble.



Los derivados obtenidos sobre el soporte GLX son apropiados como referencia para comparar con las enzimas inmovilizadas sobre OCGLX. La CALB aminada pudo ser inmovilizada tanto a pH 9 como a pH 10 sobre el soporte glioxil (**Figuras 42 y 43**), aunque a pH 10 la velocidad y rendimiento de inmovilización fueron más altas. Además, la inmovilización fue más rápida para la enzima aminada que usando la enzima sin modificar a pH 10 (la cual no pudo ser inmovilizada a pH 9). En este sentido, el derivado GLXCALB fue únicamente preparado a pH 10.

Figura 42. Cinética de inmovilización de las diferentes lipasas sobre el soporte glioxil agarosa a pH 9. Panel A: CALB, Panel B: RML, Panel C: TLL. Línea sólida: lipasas aminadas, Línea punteada: lipasas no-aminadas. Círculos: suspensión, cuadrados: sobrenadante, triángulos: enzima soluble.

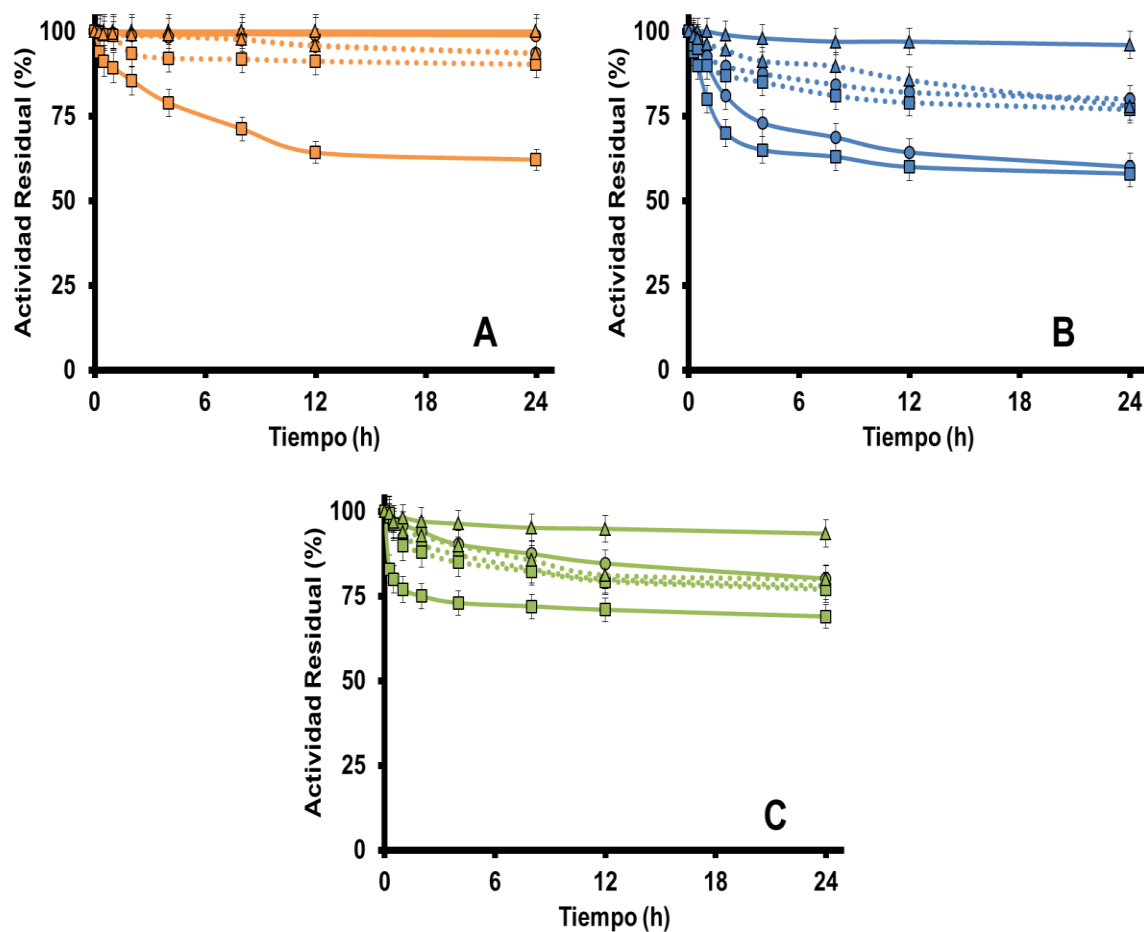
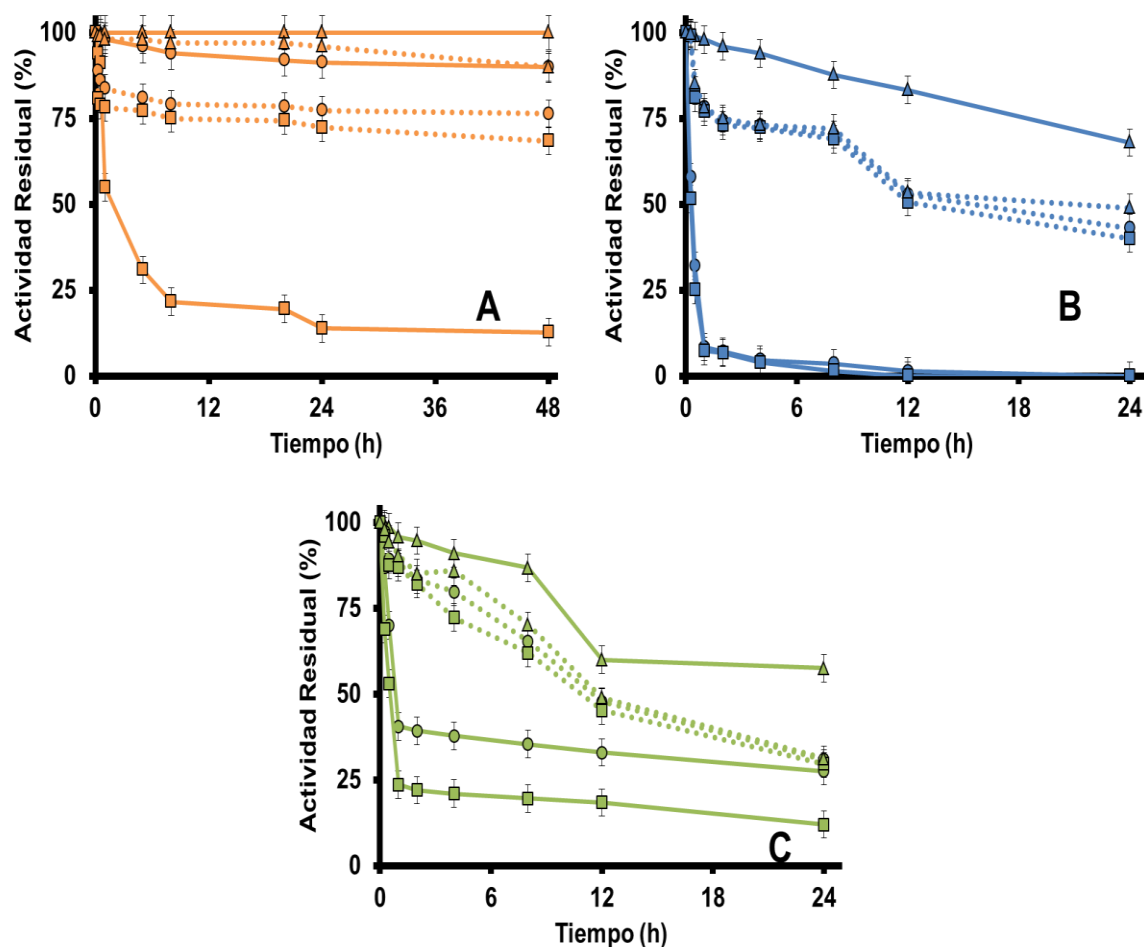


Figura 43. Cinética de inmovilización de las diferentes lipasas sobre el soporte glioxil agarosa a pH 10. Panel A: CALB, Panel B: RML, Panel C: TLL. Línea sólida: lipasas aminadas, Línea punteada: lipasas no-aminadas. Círculos: suspensión, cuadrados: sobrenadante, triángulos: enzima soluble.



La RML aminada fue inmovilizada rápidamente a pH 10, pero casi toda la actividad enzimática desapareció luego de su inmovilización (la enzima libre fue un poco inestable a pH 10, tanto la aminada como la no aminada), de forma similar a pH 9 la enzima es inmovilizada pero su actividad no se mantuvo. Por ello, los derivados de la RML inmovilizada sobre el soporte glioxil no fueron preparados a pH 9 o a

pH 10. A pH 10, la enzima sin modificar fue inmovilizada lentamente y fue inactivada durante el proceso.

Usando TLL, la enzima sin modificar mostró una baja recuperación en su actividad a pH 10 y no fue inmovilizada a pH 9, mientras que la enzima aminada permitió conservar una parte de la actividad de la enzima luego de su inmovilización a pH 9 o pH 10. En comparación con otros estudios (Rodrigues y col., 2009), la activación del soporte es menor (30 $\mu\text{mol/g}$ frente a 57 $\mu\text{mol/g}$), lo cual puede ser la causa de obtener una velocidad de inmovilización baja y disminuir las posibilidades de alcanzar una unión covalente multi-puntual intensa. La enzima aminada libre fue ligeramente más estable a pH alcalino que la enzima no modificada.

En la inmovilización de enzimas sobre el soporte GLX, sólo pudieron ser obtenidos los derivados GLXCALB y GLXCALB-A, que fueron usados como referencias en posteriores estudios.

4.5.2 Preparación de los biocatalizadores de OC y OCGLX

La inmovilización de CALB-A sobre OC u OCGLX no produjo un incremento en la actividad frente a pNPB (**Figura 44 y 45**), lo cual fue similar a los resultados obtenidos usando CALB sin modificar (Rueda y col., 2015).

La inmovilización de RML-A y TLL-A sobre octil agarosa produjo un incremento del 50% sobre la actividad de la enzima frente a pNPB (**Figura 44**), equivalentes a los resultados obtenidos en la inmovilización sobre OCGLX (**Figura 45**) y a los obtenidos en las enzimas sin modificar (Rueda y col., 2015). Lo cual sugiere que la presencia de grupos glioxil tiene poco efecto en la inmovilización de las enzimas aminadas sobre estos soportes. La reducción de estos derivados inmovilizados (antes de incubar a pH 9 o 10) y su análisis mediante SDS-PAGE permitió

visualizar la mayoría de la enzima en el sobrenadante, confirmando que a este valor de pH, la reacción covalente enzima-soporte es escasa.

Figura 44. Cinética de inmovilización de las diferentes lipasas aminadas sobre el soporte octil-agarosa a pH 5. Panel A: CALB, Panel B: RML, Panel C: TLL. Círculos: suspensión, cuadrados: sobrenadante, triángulos: enzima soluble.

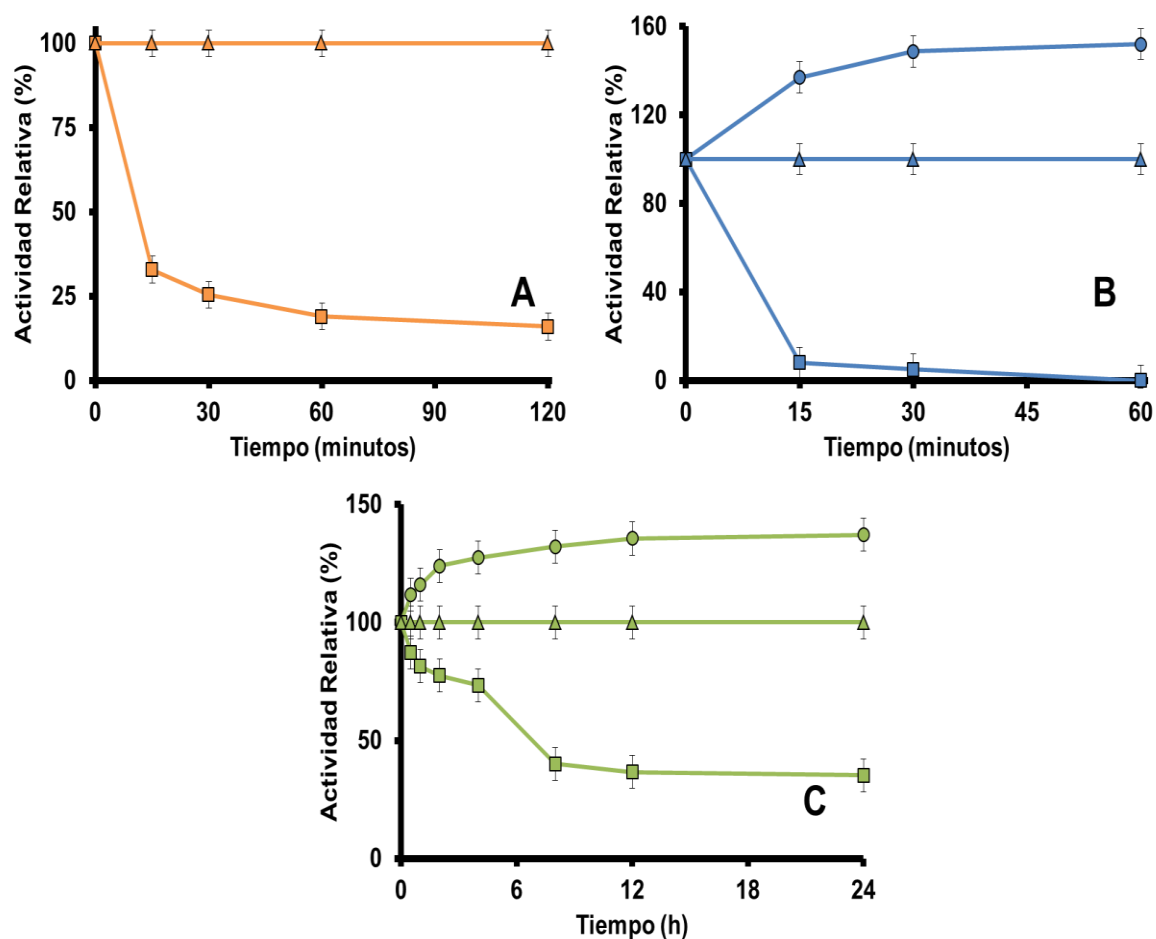
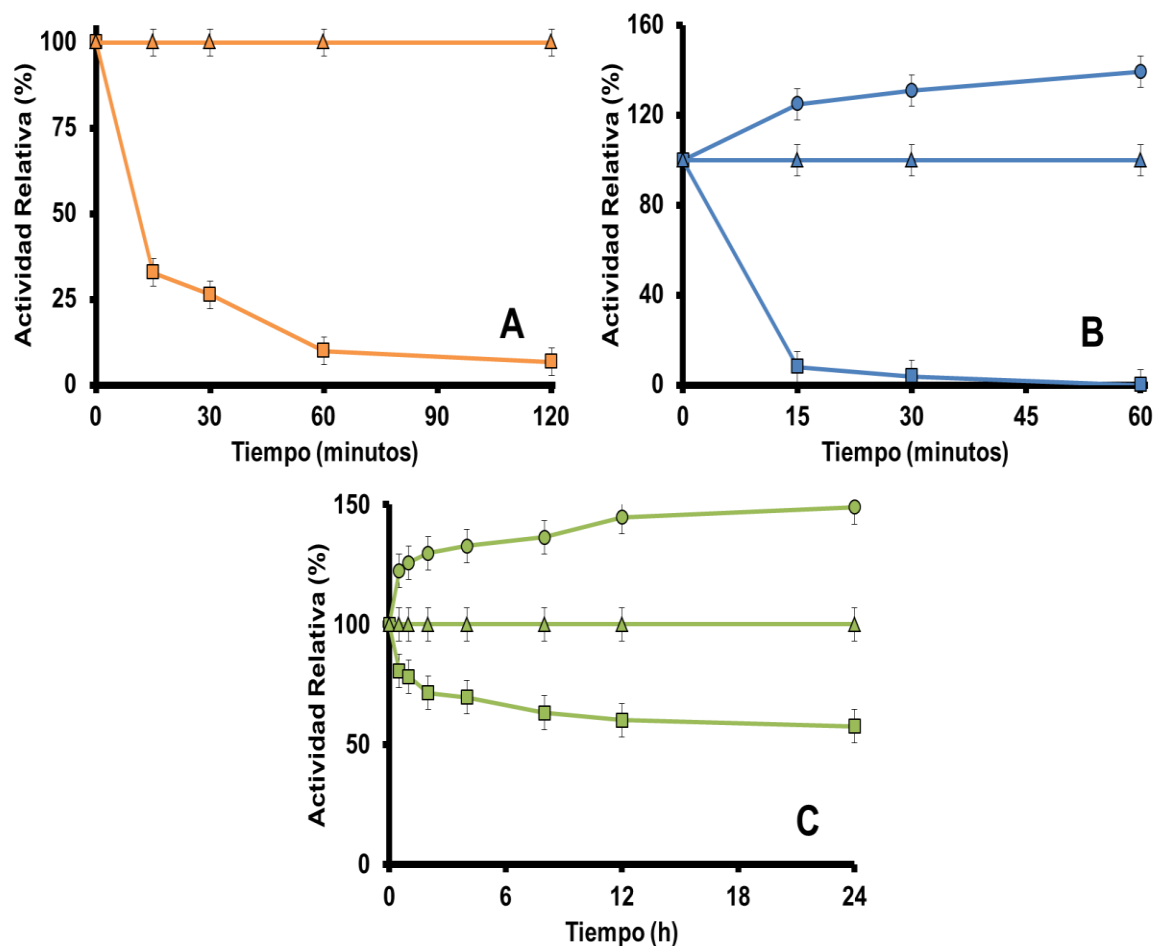


Figura 45. Cinética de inmovilización de las diferentes lipasas aminadas sobre el soporte octil-glioxil agarosa a pH 5. Panel A: CALB, Panel B: RML, Panel C: TLL. Círculos: suspensión, cuadrados: sobrenadante, triángulos: enzima soluble.

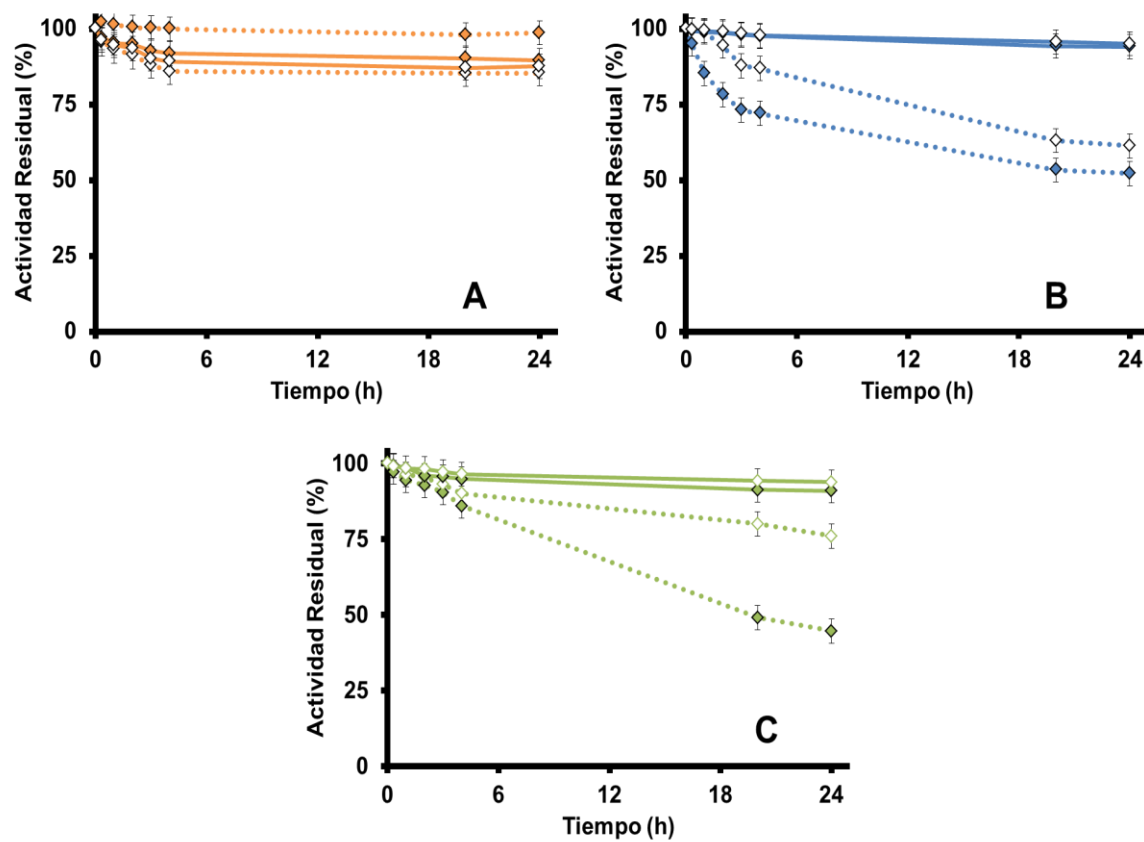


Para generar las interacciones covalentes enzima-soporte, las enzimas inmovilizadas sobre OCGLX fueron incubadas a pH 9 o 10 (**figura 46**). Usando CALB, la actividad se mantuvo alrededor de un 80% durante 24 horas. RML perdió parte de su actividad inicial durante la incubación, a pH 10 su actividad disminuyó a un 50% y a pH 9 a alrededor del 60% luego de 24 horas. Sin embargo, RML-A mantuvo su actividad casi intacta luego de 24 horas a los dos valores de pH. Los

resultados pueden deberse a la estabilización de la enzima obtenida por la activación interfacial frente al soporte e incluso por el rápido establecimiento de algunas interacciones covalentes enzima-soporte.

Usando TLL, los resultados fueron similares a los obtenidos usando RML, pero la disminución de la actividad de la enzima no-aminada fue mayor a pH 10 (45% luego de 24 horas) y más baja a pH 9 (75% luego de 24 horas).

Figura 46. Efecto de la incubación a pH 9 y pH 10 sobre la actividad enzimática de las diferentes lipasas aminadas y no-aminadas inmovilizadas sobre el soporte octil-glixil agarosa. Panel A: CALB, Panel B: RML y Panel C: TLL. Línea sólida: lipasas aminadas, Líneas punteadas: lipasas no-aminadas. Rombos llenos: incubación a pH 10, rombos vacíos: incubación a pH 9.



Mediante SDS-PAGE es posible visualizar si las moléculas de enzima han sido inmovilizadas covalentemente o permanecen adsorbidas sobre la superficie del soporte. Previamente se ha reportado (Rueda y col., 2015), usando SDS-PAGE, que la incubación a pH 10 de CALB permitió tener un máximo de 85% de moléculas de enzima inmovilizadas covalentemente, lo cual sugiere que un 15% de enzima fue desorbida al medio. Por lo anterior, esta técnica fue usada sobre los biocatalizadores preparados para determinar el tipo de interacción enzima-soporte formado.

La **figura 47** muestra que la incubación a pH 9 de OCGLXCALB no permite establecer uniones covalentes entre las moléculas de enzima y el soporte, sugiriendo que a este pH la reactividad de los grupos ϵ amino de las Lys es bajo. Sin embargo, la enzima aminada fue inmovilizada rápidamente mediante interacciones covalentes sobre el soporte OCGLX. De hecho, luego de 20 minutos de incubación a pH 9 o 10, la mayoría de las moléculas enzimáticas fueron covalentemente inmovilizadas. Este resultado puede deberse al incremento de grupos amino sobre la superficie de la enzima, a la alta movilidad (el brazo espaciador es un enlace amino secundario con dos grupos CH_2) y su bajo pK (Rodrigues y col., 2014). De igual manera, se observó que tanto para RML (**Figura 48**) y TLL (**Figura 49**) el comportamiento de la enzima no-aminada y de la aminada fue similar al descrito para CALB.

El uso de enzimas aminadas permitió obtener un 100% de moléculas de enzima inmovilizadas covalentemente y mejorar su estabilidad luego de su incubación a valores de pH alcalinos.

Figura 47. Análisis SDS-PAGE de los derivados aminados y no-aminados de CALB incubados a pH 9 y 10 y reducidos con borohidruro de sodio a diferentes tiempos. Panel A: derivados OCGLXCALB incubado a pH 9; Línea 1: marcadores de peso molecular, Línea 2: OCGLX, Línea 3: OCGLX incubado por 20 minutos, Línea 4: OCGLX incubado por 2 horas, Línea 5: OCGLX incubado por 4 horas, Línea 6: OCGLX incubado por 24 horas. Panel B: derivados OCGLXCALB-A incubados a pH 9 y 10; Línea 1: marcadores de peso molecular, Línea 2: OC, Línea 3: OCGLX, línea 4: OCGLX incubado a pH 10 por 20 minutos, Línea 5: OCGLX incubado a pH 10 por 2 horas, Línea 6: OCGLX incubado a pH 10 por 24 horas, Línea 7: OCGLX incubado a pH 9 por 20 min, Línea 8: OCGLX incubado a pH 9 por 2 horas, Línea 9: OCGLX incubado a pH 9 por 24 horas.

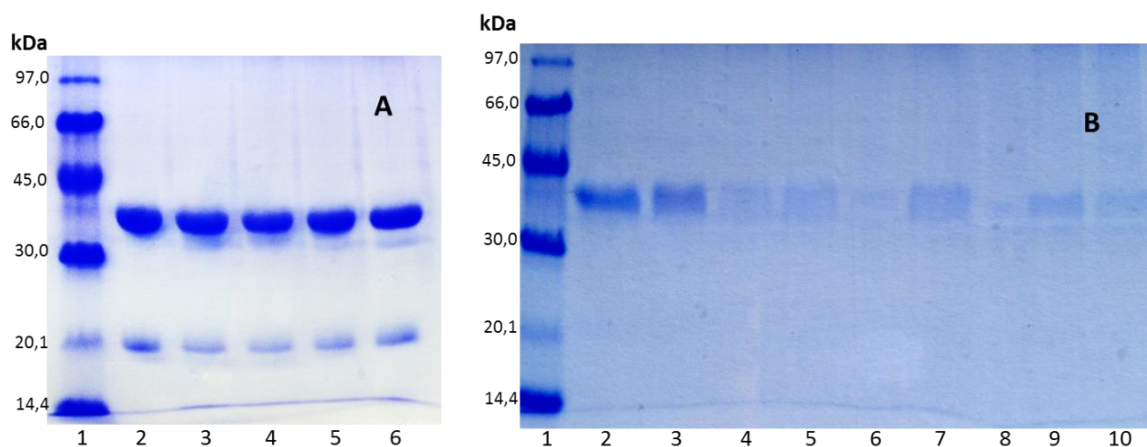


Figura 48. Análisis SDS-PAGE de los derivados aminados y no-aminados de RML incubados a pH 9 y 10 y reducidos con borohidruro de sodio a diferentes tiempos. Panel A: derivados OCGLXRML incubado a pH 9; Línea 1: marcadores de peso molecular, Línea 2: OCGLX, Línea 3: OCGLX incubado por 20 minutos, Línea 4: OCGLX incubado por 2 horas, Línea 5: OCGLX incubado por 4 horas, Línea 6: OCGLX incubado por 24 horas. Panel B: derivados OCGLXRML-A incubados a pH 9 y 10; Línea 1: marcadores de peso molecular, Línea 2: OC, Línea 3: OCGLX, línea 4: OCGLX incubado a pH 10 por 20 minutos, Línea 5: OCGLX incubado a pH 10 por 2 horas, Línea 6: OCGLX incubado a pH 10 por 24 horas, Línea 7: OCGLX incubado a pH 9 por 20 min, Línea 8: OCGLX incubado a pH 9 por 2 horas, Línea 9: OCGLX incubado a pH 9 por 24 horas.

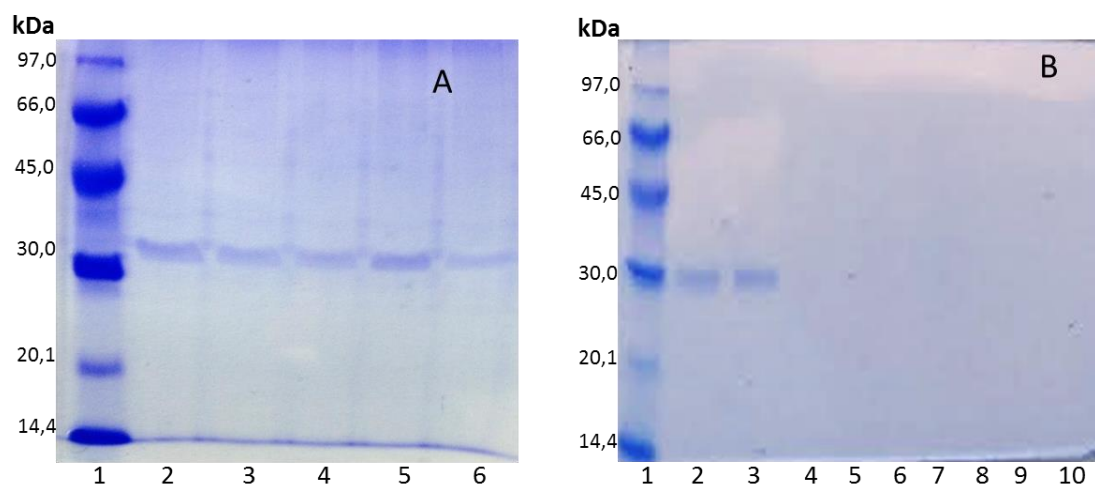
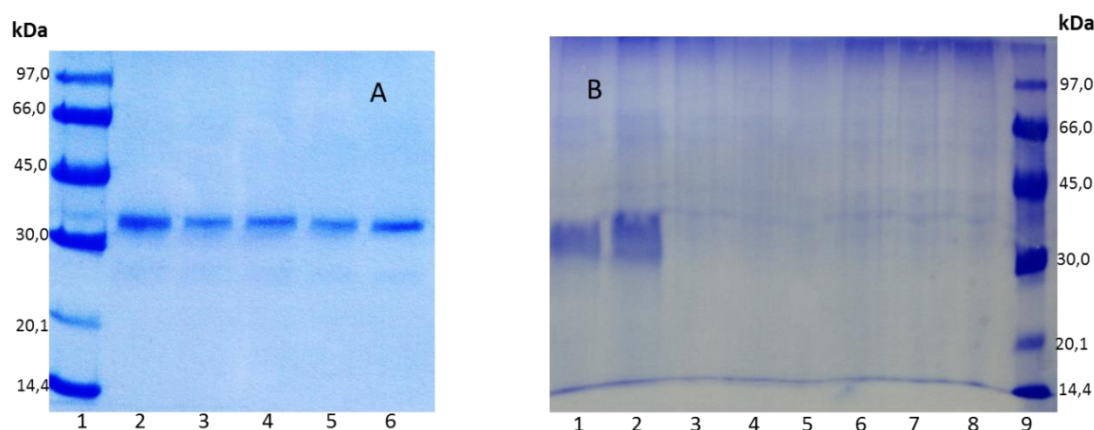


Figura 49. Análisis SDS-PAGE de los derivados aminados y no-aminados de TLL incubados a pH 9 y 10 y reducidos con borohidruro de sodio a diferentes tiempos. Panel A: derivados OCGLXTLL incubado a pH 9; Línea 1: marcadores de peso molecular, Línea 2: OCGLX, Línea 3: OCGLX incubado por 20 minutos, Línea 4: OCGLX incubado por 2 horas, Línea 5: OCGLX incubado por 4 horas, Línea 6: OCGLX incubado por 24 horas. Panel B: derivados OCGLXTLL-A incubados a pH 9 y 10; Línea 1: marcadores de peso molecular, Línea 2: OC, Línea 3: OCGLX, línea 4: OCGLX incubado a pH 10 por 20 minutos, Línea 5: OCGLX incubado a pH 10 por 2 horas, Línea 6: OCGLX incubado a pH 10 por 24 horas, Línea 7: OCGLX incubado a pH 9 por 20 min, Línea 8: OCGLX incubado a pH 9 por 2 horas, Línea 9: OCGLX incubado a pH 9 por 24 horas.



4.5.3 Disposición de los grupos reactivos de las diferentes enzimas

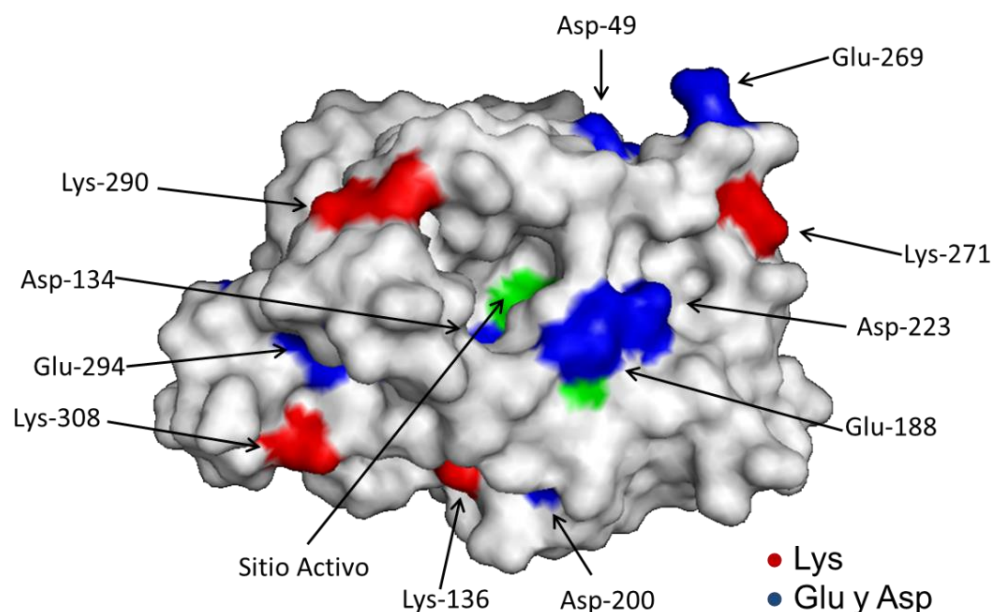
La lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) tiene en su superficie 9 Lys y 1 Leu, expuestas en cierto grado al medio y con los grupos amino primario disponibles para reaccionar con los grupos glioxil. En la cara del centro activo (**Tabla 10** y **figura 50**), que es muy relevante en este caso, existen 4 Lys de las cuales solo 3 (271, 290, 308) están lo suficientemente cercanas para que puedan reaccionar con el soporte. La Lys 290 parece ser la mejor ubicada para obtener una reacción

covalente de la enzima con el soporte luego de la adsorción. En consecuencia, se logró una inmovilización covalente con un 85% de moléculas de CALB sobre OCGLX, pero alrededor del 15% de las moléculas parecen no disponibles para reaccionar, quizás porque no hay un grupo glioxil cercano a esta Lys. La aminación de la enzima aumentó el número de grupos amino, ya que hay 2 Asp y 2 Glu (Asp 49 y 223, Glu 188 y 269) con un alto grado de exposición, incluso Asp 223 y Glu 188 son muy cercanas al área involucrada en la adsorción de la enzima. Con la metodología empleada se logró incrementar el número de moléculas covalentemente inmovilizadas en un 100%.

Tabla 10. Residuos aminoacídicos en la cara del centro activo de CALB, RML y TLL y su porcentaje de accesibilidad relativa (ASA) al medio.

Residuo	CALB		RML		TLL	
	Número	%ASA	Número	%ASA	Número	%ASA
N-terminal	Leu-1	59.6	Gly-1	92.8	Glu-1	72.7
Lys	136	24.3	106	48.6	24	54.4
	271	35	109	34.5	98	29.2
	290	45.2			127	28.2
	308	35				
Asp	49	59.6	39	74.1	27	72.7
	134	1.2	91	23.5	57	50.6
	187	2.1	113	29.8	62	61.6
	200	1.4	226	58.2	96	66.5
	223	51.9	243	51.9	102	85.9
			256	24.9	111	37.4
					122	88.6
					254	36.7
Glu	188	46.9	201	30.9	56	42.4
	269	92.7	240	18.9	87	74.4
	294	7.4			99	55
					210	14.3

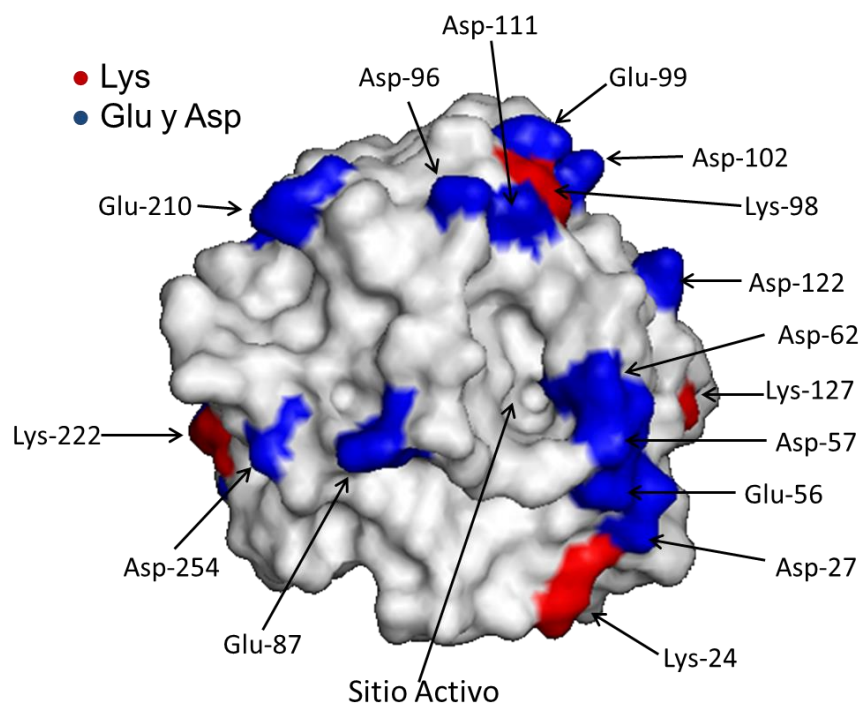
Figura 50. Modelo de estructura 3D de la superficie de CALB (conformación abierta) indicando los residuos lisínicos y los ácidos carboxílicos. Verde: residuos de la triada catalítica, rojo: residuos de Lys, azul: residuos de Asp y Glu. La estructura de superficie 3D fue modelada usando el visualizador Pymol 0.99. La estructura 3D de CALB fue obtenida de Protein Data bank (PDB), código 1TCA.



La lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) es la enzima nativa que provee los más bajos rendimientos de inmovilización covalente luego de su adsorción sobre OCGLX. La **figura 51** y **tabla 10** muestra que la TLL posee una Lys 24 que se encuentra en una posición que podría generar una reacción covalente y la Lys 98 que tiene un grado de exposición bajo. La aminación química produce un cambio drástico, ya que 12 nuevos grupos amino son generados en la cara del sitio activo (considerando los COOH expuestos) y muchos de ellos están muy bien posicionados para obtener una unión covalente luego de la adsorción sobre OCGLX (ej., Glu 87 y 56, Asp 62, 57, 27, 96 o 111), por lo cual ahora es más factible lograr una unión covalente multipuntual a pesar de las limitaciones del soporte OCGLX (impedimentos estéricos debidos a las cadenas octil y el bajo

número de grupos glioxil sobre el soporte). De hecho, la interacción covalente enzima-soporte es más rápida usando la enzima modificada que la no-modificada, incluso a pH 9.

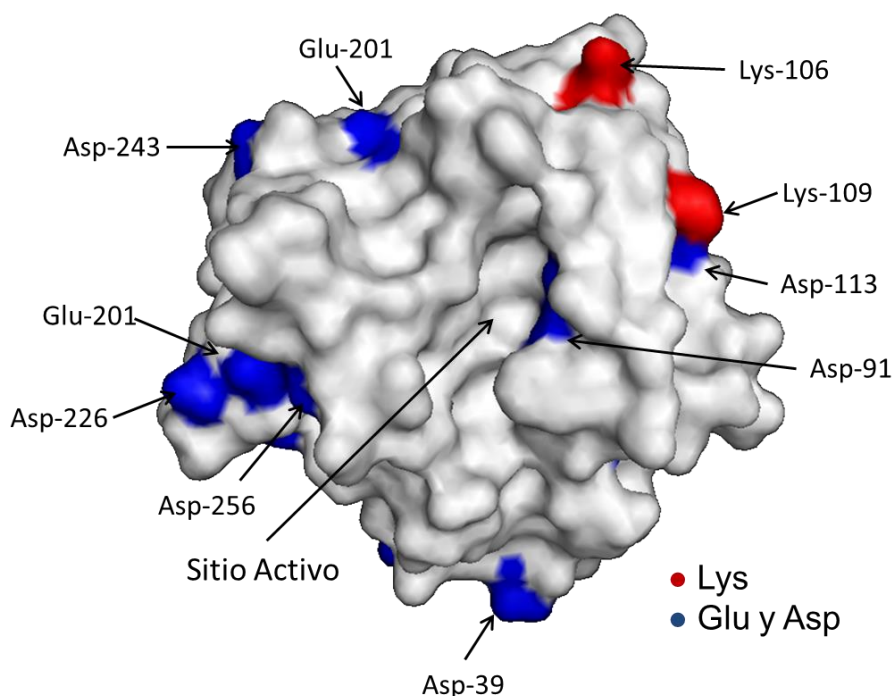
Figura 51. Modelo de estructura 3D de la superficie de TLL (conformación abierta) indicando los residuos lisínicos y los ácidos carboxílicos. Verde: residuos de la triada catalítica, rojo: residuos de Lys, azul: residuos de Asp y Glu. La estructura de superficie 3D fue modelada usando el visualizador Pymol 0.99. La estructura 3D de TLL fue obtenida de Protein Data bank (PDB), código 1DT3.



La lipasa de *Rhizomucor miehei* (RML) (**figura 52**) tiene dos grupos Lys en posiciones que pueden permitir la reacción covalente de la enzima luego de su adsorción mediante activación interfacial (Lys 106 y 109). La aminación

incrementó a 10 el número de grupos amino, haciendo más factible la unión covalente multipuntual, probablemente a través de los residuos Asp 39 y 91 aminados.

Figura 52. Modelo de estructura 3D de la superficie de RML (conformación abierta) indicando los residuos lisínicos y los ácidos carboxílicos. Verde: residuos de la triada catalítica, rojo: residuos de Lys, azul: residuos de Asp y Glu. La estructura de superficie 3D fue modelada usando el visualizador Pymol 0.99. La estructura 3D de RML fue obtenida de Protein Data bank (PDB), código 4TGL.



4.5.4 Estabilidad de las diferentes preparaciones enzimáticas

La **tabla 11** presenta la vida media de los diferentes biocatalizadores inactivados térmicamente. La aminación de CALB produce una pequeña caída en la estabilidad del derivado OC a pH 5 y 7, y un incremento significativo a pH 9 (casi 4

veces). Diferentes efectos de la modificación a diferentes valores de pH se pueden observar, considerando los cambios en las propiedades físicas de la superficie que ha sufrido la enzima, ya que a pH 9 el número de grupos amino protonados de la enzima modificada disminuye. La inmovilización sobre GLX de la enzima modificada y no-modificada produce biocatalizadores con estabilidades similares a los tres valores de pH estudiados (quizás la baja activación del soporte no permite una unión covalente multipuntual) que son más bajas que las de los derivados OC. Usando CALB-A sobre OCGLX, la vida media mejoró en un factor de dos a pH 5 y sobre 3 veces a pH 7 y 9, comparadas con OC. La enzima aminada inmovilizada sobre OCGLX, comparada con la no-aminada sobre el mismo soporte, la mejora obtenida de la estabilidad fue de dos veces, excepto a pH 9 donde fue de 3 veces. En presencia de 80% (v/v) dioxano (**tabla 12**), las diferencias usando OCGLX son mayores en las enzimas aminadas que en las no-aminadas, mejorando su vida media por un factor de 100 veces. Sin embargo, las diferencias entre OC y OCGLX a pH 9 o 10 no son muy relevantes.

Tabla 11. Vida media (en minutos) de los diferentes biocatalizadores inactivados térmicamente. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe previamente. CALB (pH 5 – 80°C, pH 7 – 70°C, pH 9 – 60°C), RML (pH 5 – 60°C, pH 7 – 50°C, pH 9 – 45°C) y TLL (pH 5 – 75°C, 70°C a pH 7 y pH 9).

BIOCATALIZADOR	Vida media (minutos)		
	pH 5	pH 7	pH 9
OC CALB	37 ± 1.9	21 ± 1.1	5 ± 0.3
OCGLX CALB pH 10	36 ± 1.3	25 ± 1.3	20 ± 1.0
GLX CALB	5 ± 0.4	5 ± 0.2	5 ± 0.3
OC CALB-A	33 ± 1.7	15 ± 0.8	19 ± 0.9
OCGLX CALB-A pH 9	20 ± 1.0	31 ± 1.6	27 ± 1.4
OCGLX CALB-A pH 10	60 ± 3.0	53 ± 2.7	65 ± 3.3
GLX CALB-A	5 ± 0.3	5 ± 0.3	5 ± 0.3
OC RML	35 ± 1.8	60 ± 3.0	20 ± 1.0
OCGLX RML pH 10	109 ± 5.5	127 ± 6.4	56 ± 2.8
OC RML-A	109 ± 5.5	1500 ± 57	110 ± 6.0
OCGLX RML-A pH 9	175 ± 8.8	3100 ± 80	1800 ± 75
OCGLX RML-A pH 10	315 ± 16	7800 ± 196	2220 ± 105
OC TLL	23 ± 1.2	44 ± 2.2	25 ± 1.3
OCGLX TLL pH 10	21 ± 1.1	13 ± 0.7	15 ± 0.8
OC TLL-A	20 ± 1.0	15 ± 0.8	10 ± 0.5
OCGLX TLL-A pH 9	21 ± 1.1	37 ± 1.9	10 ± 0.5
OCGLX TLL-A pH 10	90 ± 4.5	132 ± 6.6	70 ± 3.5

Tabla 12. Vida media (en minutos) de los diferentes biocatalizadores incubados en solventes orgánicos a 30°C. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe previamente.

BIOCATALIZADOR	Vida media (minutos)		
	80% Dioxano	30% ACN	60% Dioxano
OC CALB	144 ± 7.2	-	-
OCGLX CALB pH 10	240 ± 12	-	-
GLX CALB	192 ± 9.0	-	-
OC CALB-A	6050 ± 96	-	-
OCGLX CALB-A pH 9	7100 ± 105	-	-
OCGLX CALB-A pH 10	8100 ± 208	-	-
GLX CALB-A	348 ± 17	-	-
OC RML	-	5 ± 0.3	-
OCGLX RML pH 10	-	30 ± 1.5	-
OC RML-A	-	1211 ± 60	-
OCGLX RML-A pH 9	-	3605 ± 78	-
OCGLX RML-A pH 10	-	9875 ± 300	-
OC TLL	-	-	72 ± 4
OCGLX TLL pH 10	-	-	860 ± 43
OC TLL-A	-	-	114 ± 5
OCGLX TLL-A pH 9	-	-	660 ± 33
OCGLX TLL-A pH 10	-	-	4510 ± 98

La aminación de RML produjo una mejora general en la estabilidad de las preparaciones OC, con una estabilización muy alta a pH 7 (casi 20 veces) y pH 9 (6 veces) y una estabilidad moderada a pH 5 (3 veces). Además, la inmovilización de la enzima aminada sobre OCGLX permitió superar claramente estos valores de estabilidad; a pH 5, el OCGLXRML-A es alrededor de tres veces más estable que el OCRML-A, a pH 7 es cinco veces más estable y a pH 9 la estabilización alcanzó

un factor de 20 veces. Comparando estos valores con los de la enzima no-aminada inmovilizada sobre OCGLX, las diferencias oscilan entre menos de tres veces a pH 5 hasta más de 60 veces a pH 7. La estabilización de RML en acetonitrilo (**tabla 12**) es más significativa comparando la enzima aminada y la no-aminada inmovilizada sobre OCGLX (alrededor de 330 veces), incluso si se compara la enzima modificada y la no modificada que fue inmovilizada sobre el soporte OC se obtuvo una mejora en la estabilidad de 220 veces.

TLL también mejoró de forma significativa su estabilidad bajo cualquier condición distorsionante comparando las preparaciones OCGLX: en inactivación térmica entre 4 y 10 veces y alrededor de 5 en 60% (v/v) dioxano.

De esta manera, la aminación de estas tres enzimas permitió no solo tener mayores actividades y al menos un enlace covalente para el 100% de las moléculas de enzima, sino también permitió incrementar la estabilidad de la enzima luego de su inmovilización sobre OCGLX. En general, si la incubación se lleva a cabo a pH 9, la estabilidad disminuye, sugiriendo una baja unión covalente entre la enzima y el soporte. En los análisis mediante SDS-PAGE no se observó liberación de la enzima y a la vez su orientación sobre los soportes OCGLX es esencialmente la misma, se puede concluir que a pH 10 se generó una unión covalente multipuntual.

4.5.5 Actividad hidrolítica de las diferentes preparaciones enzimáticas en presencia de diferentes concentraciones de acetonitrilo

Las actividades de los diferentes biocatalizadores en presencia de concentraciones crecientes de acetonitrilo (ACN) fueron determinadas usando como sustrato hexanoato de etilo (**tabla 13**).

Tabla 13. Efecto de las diferentes concentraciones de acetonitrilo sobre la actividad de los biocatalizadores lipásicos. Las reacciones fueron llevadas a cabo usando como sustrato hexanoato de etilo 25 mM a pH 7 y 25°C. La actividad es presentada en μmol de sustrato hidrolizado por minuto y mg de enzima inmovilizada. *Actividad ($\times 10$), ** Actividad ($\times 10^2$).

BIOCATALIZADOR	Actividad enzimática				
	Sistema Bifásico	25% ACN	50% ACN	75% ACN	90% ACN
OC CALB	920.0 $\pm$ 46	3270.0 $\pm$ 164	708.0 $\pm$ 35.4	38.4 $\pm$ 1.9	37.2 $\pm$ 1.9
OCGLX CALB pH 10	1605.6 $\pm$ 80	2500.0 $\pm$ 125	902.2 $\pm$ 45.1	58.0 $\pm$ 2.9	50.9 $\pm$ 2.5
GLX CALB	1275.0 $\pm$ 64	2452.5 $\pm$ 123	100.0 $\pm$ 5.0	17.3 $\pm$ 0.9	12.5 $\pm$ 0.6
OC CALB-A	944.4 $\pm$ 47	2133.3 $\pm$ 107	142.2 $\pm$ 7.1	20.8 $\pm$ 1.0	12.3 $\pm$ 0.6
OCGLX CALB-A pH 9	1324.2 $\pm$ 66	4664.4 $\pm$ 233	958.9 $\pm$ 47.9	57.1 $\pm$ 2.9	22.8 $\pm$ 1.1
OCGLX CALB-A pH 10	1454.5 $\pm$ 73	4071.4 $\pm$ 203	1039.0 $\pm$ 51.9	54.7 $\pm$ 2.7	24.4 $\pm$ 1.2
GLX CALB-A	568.8 $\pm$ 28	1197.5 $\pm$ 60	35.3 $\pm$ 1.8	21.3 $\pm$ 1.1	15.0 $\pm$ 0.8
OC RML	67.0 $\pm$ 3.4*	532.0 $\pm$ 27*	2.6 $\pm$ 0.1*	0.6 $\pm$ 0.0*	2.5 $\pm$ 0.1*
OCGLX RML pH 10	75.0 $\pm$ 3.8*	290.0 $\pm$ 15*	5.5 $\pm$ 0.6*	1.6 $\pm$ 0.1*	3.9 $\pm$ 0.2*
OC RML-A	60.0 $\pm$ 3.0*	189.0 $\pm$ 9.5*	0.6 $\pm$ 0.0*	0.2 $\pm$ 0.0*	0.4 $\pm$ 0.0*
OCGLX RML-A pH 9	1066.7 $\pm$ 53*	6050.0 $\pm$ 303*	131.0 $\pm$ 6.6*	15.0 $\pm$ 0.8*	36.5 $\pm$ 1.8*
OCGLX RML-A pH 10	1733.3 $\pm$ 87*	7450.0 $\pm$ 373*	168.0 $\pm$ 8.4*	68.9 $\pm$ 3.4*	58.5 $\pm$ 2.9*
OC TLL	857.1 $\pm$ 43**	46.7 $\pm$ 2.3**	0.2 $\pm$ 0.0**	5.9 $\pm$ 0.3**	6.2 $\pm$ 0.3**
OCGLX TLL pH 10	1071.4 $\pm$ 54**	3346.9 $\pm$ 167**	17.3 $\pm$ 0.9**	4.9 $\pm$ 0.2**	7.9 $\pm$ 0.4**
OC TLL-A	791.7 $\pm$ 40**	463.0 $\pm$ 23**	5.3 $\pm$ 0.3**	3.1 $\pm$ 0.2**	2.1 $\pm$ 0.1**
OCGLX TLL-A pH 9	1417.4 $\pm$ 71**	3988.6 $\pm$ 199**	44.9 $\pm$ 2.2**	11.4 $\pm$ 0.6**	15.7 $\pm$ 0.8**
OCGLX TLL-A pH 10	1812.7 $\pm$ 91**	4467.4 $\pm$ 223**	59.3 $\pm$ 3.0**	12.6 $\pm$ 0.6**	18.0 $\pm$ 0.9**

La aminación de CALB, produjo un efecto negativo sobre la actividad enzimática en medio acuoso del derivado OC; además, el efecto negativo incrementó cuando la concentración del solvente orgánico también aumentó. Comparando GLXCALB-A y GLXCALB, la actividad en medio acuoso es más baja (más de dos veces) para la enzima aminada, pero la estabilidad en presencia de acetonitrilo es más alta cuando la concentración del solvente es igual o mayor al 75%. El uso del soporte

OCGLX mejoró notablemente la actividad de las enzimas aminadas y no aminadas en ausencia de acetonitrilo y permitió retener más actividad que con las lipasas inmovilizadas sobre el soporte OC, alrededor del doble de actividad con la enzima aminada. Además, el derivado OCGLXCALB-A presentó una alta activación a una concentración de 25% de acetonitrilo, siendo el derivado más activo bajo estas condiciones. La incubación del derivado OCGLXCALB-A a pH 9 no es muy significativa frente a la incubación a pH 10, sugiriendo que el efecto principal es solamente prevenir la desorción de la enzima más que la rigidificación de la lipasa (Rueda y col., 2015).

La aminación produce una disminución en la actividad de la lipasa de *Rhizomucor miehei* inmovilizada sobre OC, la cual es pequeña en el sistema bifásico, pero se hace más relevante a medida que incrementa la concentración de solvente orgánico. En presencia de 25% acetonitrilo, se observó un incremento en la actividad de los derivados, el cual es más relevante para la enzima no-aminada (casi 8 veces, comparada con la enzima en el sistema bifásico) a pesar de que la estabilidad de la enzima aminada es mayor (**tabla 13**). La inmovilización sobre el soporte OCGLX de la RML-A produce un incremento significativo en su actividad, incluso en el sistema bifásico. En presencia de 50% acetonitrilo, los derivados OCGLXRML-A son 30 veces más activos que las preparaciones con la enzima no-aminada. En este caso, la incubación a pH 10 permitió mejorar la actividad comparada con el derivado incubado a pH 9, sugiriendo que la rigidificación de la enzima puede jugar un rol importante en este caso.

La aminación del derivado OCTLL produjo una disminución en la actividad de la enzima en la hidrólisis del sustrato en un sistema bifásico; así mismo, a medida que la concentración del solvente aumentó, una disminución de la actividad fue observada. El derivado aminado OCGLXTLL-A es más activo, que su contraparte no-aminada, bajo todas las condiciones de hidrólisis e incluso es el derivado más

activo en todos los casos, a pesar del porcentaje de actividad perdido a altas concentraciones de solvente.

Las tres enzimas aminadas e inmovilizadas sobre el soporte OCGLX exhibieron una alta actividad en comparación a sus equivalentes no-aminadas en la hidrólisis de hexanoato de etilo en presencia de altas concentraciones de acetonitrilo e incluso, presentan mejores resultados que las lipasas inmovilizadas sobre OC.

Al igual que las enzimas no-aminadas inmovilizadas sobre el soporte OC (Rueda y col., 2015), algunas moléculas de enzima aminadas fueron desorbidas del soporte durante su uso, lo cual puede explicar algunos de los resultados. La alta estabilidad de las lipasas inmovilizadas sobre OCGLX usando enzimas aminadas comparada con las lipasas no-modificadas, puede ser ocasionada por una alteración de la estructura de la enzima causada por la modificación química o las distorsiones generadas durante la unión covalente multipuntual (Rodrigues y col., 2014).

4.5.6 Simplificación del proceso de inmovilización

Después de analizar el uso de enzimas aminadas, se estudió la simplificación del protocolo de inmovilización sobre el soporte OCGLX mediante la aminación directa de la enzima adsorbida sobre él. En primer lugar, las enzimas CALB, RML y TLL fueron adsorbidas sobre el soporte OCGLX usando una buffer acetato de sodio 5 mM a pH 5; luego, la enzima inmovilizada fue incubada en EDA 1 M a pH 4.75, simultáneamente carbodiimida sólida a una concentración de 10 mM fue adicionada. El soporte fue lavado para eliminar la EDA remanente e incubado en buffer bicarbonato de sodio 50 mM a pH 10. Los resultados de la inmovilización covalente en términos de eficiencia, actividad y estabilidad fueron idénticos a los obtenidos previamente con las enzimas aminadas (no se muestran los resultados). Por lo anterior, este protocolo, usando la modificación química de la enzima en

fase sólida sobre el soporte OCGLX puede ser extrapolado a enzimas industriales sin muchas dificultades.

4.5.7 Solubilidad de CaCl_2 y MnCl_2 en diferentes buffers a pH 10

Las sales de CaCl_2 o MnCl_2 en concentración 5 mM, precipitaron a todas las concentraciones de buffers usadas a pH 10 (fosfato de sodio, bicarbonato de sodio, borato de sodio, Tris/NaOH, Gly/NaOH). Sin embargo, la sal de CaCl_2 fue soluble en Gly a pH 10 a concentraciones tan altas como de 100 mM. En este valor de pH y de buffer, MnCl_2 se mantuvo insoluble, razón por la cual esta sal fue descartada para continuar con los análisis. La utilización de Gly tiene un inconveniente en la reacción covalente entre la enzima y los grupos glioxil del soporte OCGLX, ya que posee un grupo amino primario que puede bloquear los grupos glioxil, haciendo más compleja la interacción covalente enzima-soporte (Mateo y col., 2005 y 2006). Sin embargo, es posible usar una baja concentración de esta buffer para evitar la posible competencia por los grupos glioxil entre la Gly y las Lys de la enzima (Bolívar y col., 2009 y 2010).

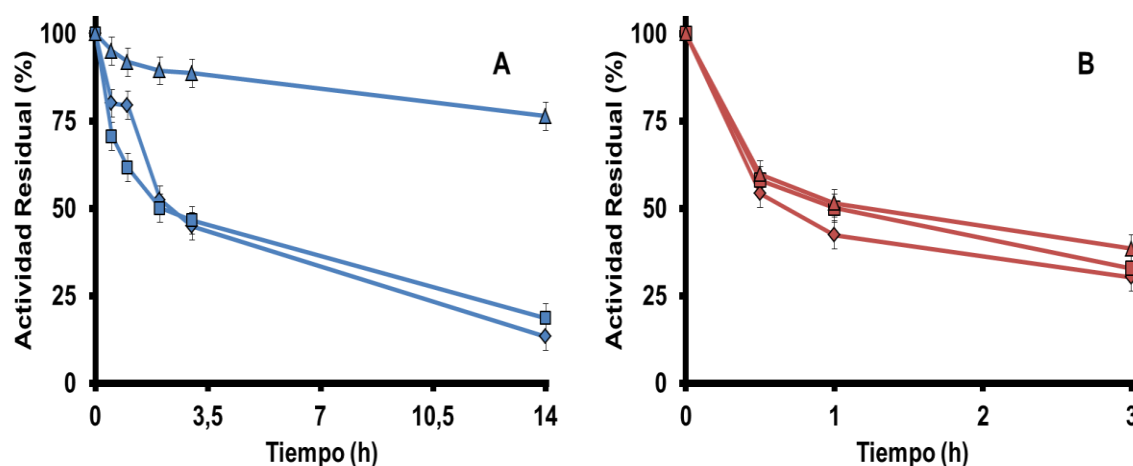
En consecuencia, una solución 2.5 mM de Gly/NaOH/5 mM CaCl_2 fue seleccionada para analizar el efecto estabilizante de Ca^{2+} a pH 10 sobre OCRML y OCCRL.

4.5.8 Efecto de CaCl_2 en la estabilidad de OCRML y OCCRL a pH 10

En la **figura 53** se presenta el efecto de 5 mM de CaCl_2 sobre la estabilidad de los derivados OCRML y OCCRL a pH 10. El derivado de OCRML a pH 10 y 30°C en ausencia de CaCl_2 mantuvo alrededor del 15% de su actividad inicial después de transcurridas 14 horas. La vida media de la preparación OC incrementó alrededor de 15 veces en presencia de esta sal, manteniendo más del 75% de su actividad. Esta estabilización fue similar a la obtenida usando CaCl_2 a pH 5.0 y 7.0

(Fernandez-Lopez y col., 2015), la cual fue obtenida mediante la adsorción del catión en algún bolsillo de la enzima que muy probablemente involucra algunos puentes iónicos.

Figura 53. Efecto de CaCl_2 sobre la estabilidad de los derivados OCRML (Panel A) y OCCRL (Panel B) a pH 10. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe previamente. La temperatura de incubación fue de 30°C y las buffers a pH 10 fueron de 5 mM bicarbonato de sodio (rombos), 5 mM glicina (cuadrados) o 5 mM glicina más 5 mM de CaCl_2 (triángulos).



El efecto de la sal sobre OCCRL no fue positivo (**Figura 53**), ya que el derivado incubado es muy inestable a pH 10; además, en ausencia o presencia de CaCl_2 la actividad del derivado disminuyó constantemente, por lo cual no se generó ningún efecto protector como en el caso de OCRML. Este resultado es totalmente opuesto al obtenido previamente para esta enzima, en presencia de Ca^{2+} a pH 5 y 7 (Fernandez-Lopez y col., 2015). Al parecer, a este valor de pH el lugar de la enzima donde el catión es adsorbido sobre OCCRL no lo reconoce, quizás debido a algún cambio conformacional, o que la inactivación toma lugar en diferentes

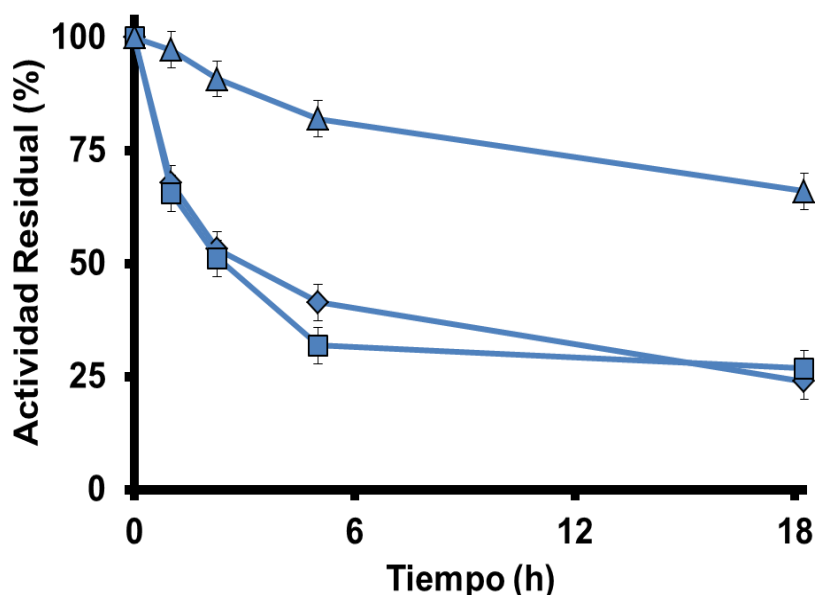
áreas de la proteína a este valor de pH, lo cual impide que el catión tenga algún efecto sobre la estabilidad de la enzima.

En consecuencia, sólo se prosiguió con el estudio del efecto de la sal de Ca^{2+} sobre la enzima RML usando como soporte OCGLX agarosa.

4.5.9 Preparación del derivado OCGLXRML en presencia de 5 mM CaCl_2 / 2.5 mM Gly

La inmovilización sobre el soporte OCGLX de la lipasa de *Rhizomucor miehei* (con un rendimiento superior al 97%) mostró la misma hiperactivación que al ser inmovilizada sobre el soporte OC. Luego de ser inmovilizado mediante adsorción, el derivado OCGLXRML fue incubado a pH 10 y 25°C en presencia o ausencia de CaCl_2 (**figura 54**). Así como disminuyó la actividad en ausencia de la sal del derivado OC, de igual manera sucedió para la preparación OCGLX, ya que luego de 3 horas en ausencia de sal, menos del 60% de la actividad inicial fue mantenida. Por otro lado, en presencia de la sal la preparación retuvo más del 90% de su actividad inicial; por consiguiente, este simple aditivo permitió reducir 4 veces la pérdida de actividad durante la incubación a pH 10 para generar las interacciones covalentes enzima-soporte.

Figura 54. Efecto de CaCl_2 en la inactivación del derivado OCGLXRML a pH 10. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe previamente. La temperatura de incubación fue de 25°C y las buffers a pH 10 fueron de 5 mM bicarbonato de sodio (rombos), 2.5 mM glicina (cuadrados) y 2.5 mM glicina más 5 mM de CaCl_2 (triángulos).

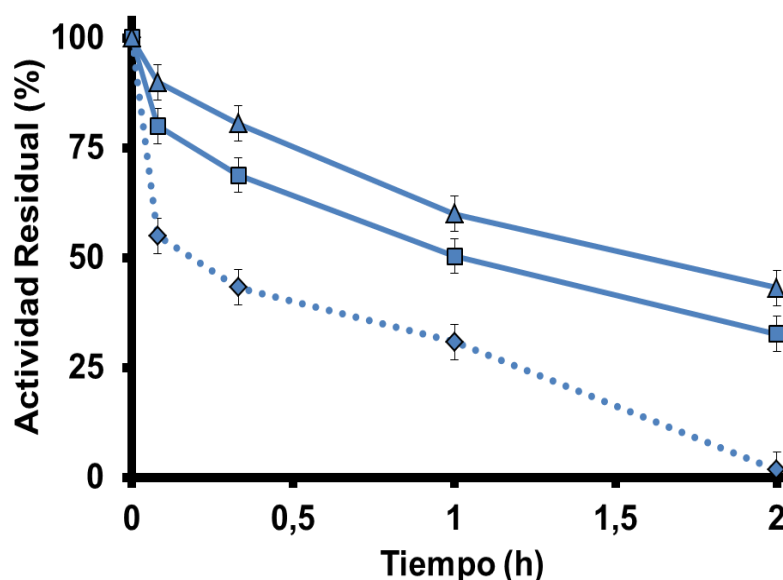


Luego de la reducción, las dos preparaciones (en presencia o ausencia de Ca^{2+} y Gly) fueron incubadas en 0.3% (v/v) de Tritón para confirmar si la enzima fue realmente unida covalentemente al soporte. En ambos casos, menos del 15% de la actividad de la enzima fue observada en el sobrenadante (en concordancia con reportes previos, Fernandez-Lopez y col., 2015), sugiriendo que la presencia de 2.5 mM de Gly no impidió la formación de al menos un enlace covalente entre la enzima y el soporte. Seguido a ello, la estabilidad de las preparaciones fue comparada bajo diferentes condiciones.

4.5.10 Estabilidad térmica a diferentes valores de pH de las preparaciones RML en presencia o ausencia de CaCl_2 y glicina

La **figura 55** muestra la inactivación térmica de OCRML, OCGLXRML y OCGLXRML preparada en presencia de Gly y Ca^{2+} (OCGLXRML-Ca). Las dos preparaciones OCGLX son más estables que la OC, como se ha reportado previamente (Suescun y col., 2015; Rueda y col., 2015); además, la presencia de Gly y Ca^{2+} durante la inmovilización tiene un efecto despreciable sobre la estabilidad de la enzima, sugiriendo que la baja cantidad de Gly usada no interfiere en el número de interacciones o uniones covalentes enzima-soporte. De hecho, la nueva preparación es alrededor del 30% más estable que la preparación estándar OCGLX y cerca de 12 veces más estable que el derivado OC. Esto puede deberse a una baja distorsión de las moléculas de enzima durante su inmovilización en presencia de Ca^{2+} , este catión probablemente se fija a una zona afín sobre la superficie de la enzima que refuerza la estructura de la lipasa.

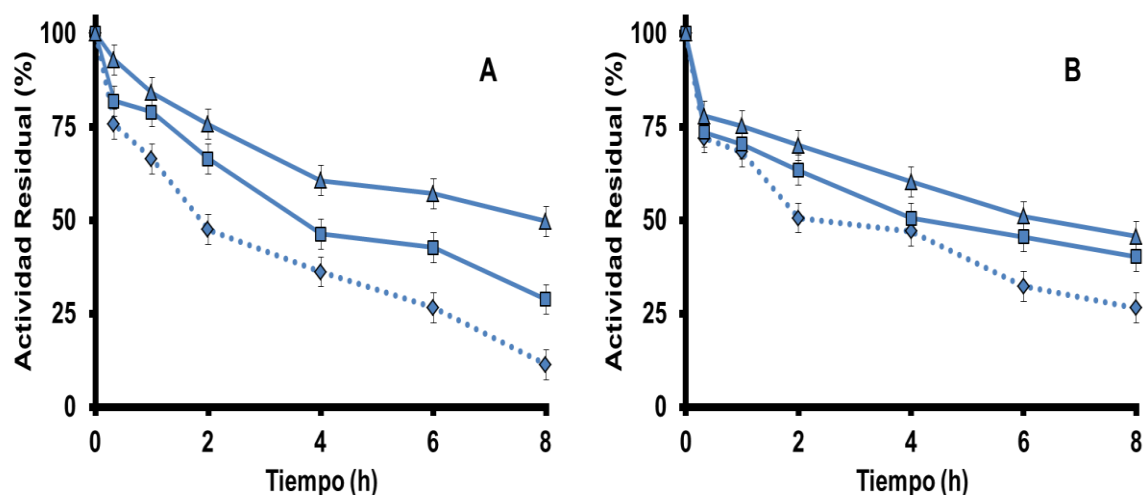
Figura 55. Inactivación térmica de las diferentes preparaciones de RML. Las inactivaciones se llevaron a cabo a 60°C en buffer acetato de sodio 5 mM a pH 5. Línea sólida: preparaciones OCGLX, Línea punteada: preparación OC. Triángulos: OCGLXRML-Ca, Cuadrados: OCGLXRML y Rombos: OC.



4.5.11 Efecto de los cationes Ca^{2+} y Mn^{2+} sobre la estabilidad térmica a pH 7 de los diferentes biocatalizadores de RML

En el capítulo dos, se estudió el efecto de los cationes Ca^{2+} y Mn^{2+} sobre diferentes derivados lipásicos inmovilizados sobre el soporte OC, encontrándose que el derivado OCRML fue estabilizado por la presencia de estos cationes (Fernandez-Lopez y col., 2015). Por consiguiente, se evaluó el efecto de los cationes estabilizantes sobre las tres preparaciones de RML, con el fin de comprobar si la inmovilización covalente tiene alguna influencia en la estabilización encontrada usando sólo preparaciones OC (**Figura 56**).

Figura 56. Efecto de los cationes Ca^{2+} y Mn^{2+} sobre la inactivación térmica de diferentes preparaciones de RML. La inactivación se llevó a cabo a 54°C en buffer TrisHCl 5 mM a pH 7 conteniendo CaCl_2 (Panel A) o MnCl_2 (Panel B). Línea sólida: preparaciones OCGLX, Línea punteada: preparación OC. Triángulos: OCGLXRML-Ca, Cuadrados: OCGLXRML y Rombos: OC.



De la **figura 56** se puede concluir que todas las preparaciones son estabilizadas en presencia de los dos cationes; puesto que al comparar los resultados obtenidos en la tabla 10 se puede apreciar que a pH 7:

- En presencia de cationes, fue necesario incrementar la temperatura de inactivación de 50°C a 54°C .
- El derivado OC (tabla 10) en ausencia de cationes, presenta una vida media de 1 hora, mientras que en presencia de Ca^{2+} alcanzó una vida media de 1.5 horas y con Mn^{2+} de 2 horas (figura 56).
- El derivado OCGLX preparado mediante incubación en buffer bicarbonato de sodio en ausencia de cationes (tabla 10) luego de 2 horas alcanzó su vida media; en comparación con el derivado en presencia de Ca^{2+} o Mn^{2+} cuya estabilidad se mantiene casi idéntica (vida media 4 Horas) (figura 56).

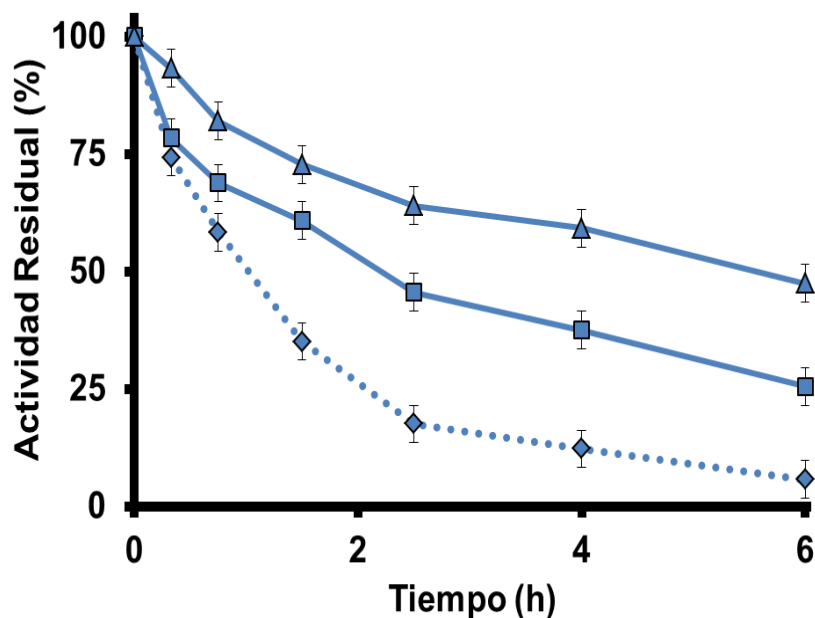
- Las preparaciones de RML inmovilizadas por adsorción y luego mediante uniones covalentes sobre el soporte OCGLX en presencia de Gly y Ca^{2+} (OCGLXRML-Ca), mejoran notablemente su estabilidad comparándolas con sus homólogas (OCGLXRML), en un factor de 2 veces (en presencia de Ca^{2+}) o de 1.5 veces (en presencia de Mn^{2+}) (figura 56).

Es notable que el Mn^{2+} tiene un efecto más estabilizante sobre los derivados OC; la presencia de los dos cationes tiene un efecto estabilizante similar sobre las preparaciones OCGLX y la presencia de Ca^{2+} incrementa significativamente la estabilidad de los derivados OCGLX-Ca. Esto sugiere que la inmovilización covalente en presencia de Ca^{2+} refuerza su efecto estabilizante, quizás generando algunos cambios en el sitio de adsorción donde este catión interacciona fuertemente.

4.5.12 Estabilidad en presencia de acetonitrilo de las diferentes preparaciones de RML

La **figura 57** presenta los resultados de la inactivación de las tres diferentes preparaciones de RML en acetonitrilo. Es evidente que el derivado OCGLXRML-Ca es el más estable de todas las preparaciones, superando al OC en un factor de 7 y al OCGLX por un factor de 3 veces. Debido a lo anterior, se analizó el efecto de Ca^{2+} o Mn^{2+} sobre la estabilización de las diferentes preparaciones en presencia de acetonitrilo bajo las mismas condiciones descritas en esta sección.

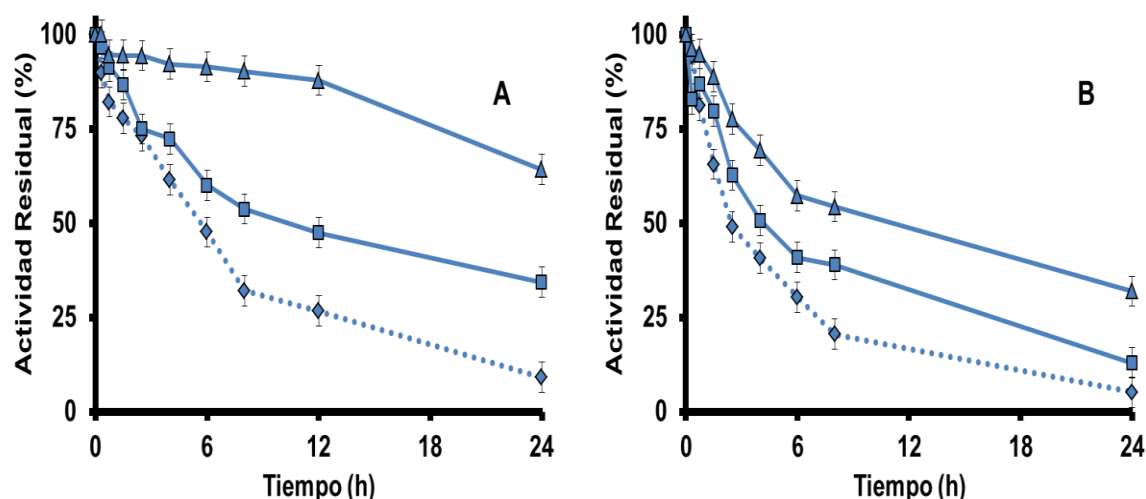
Figura 57. Inactivación en acetonitrilo de los diferentes derivados RML. Los biocatalizadores fueron incubados a 30°C en 25% (v/v) ACN / 5mM TrisHCl a pH 7. Línea sólida: preparaciones OCGLX, Línea punteada: preparación OC. Triángulos: OCGLXRML-Ca, Cuadrados: OCGLXRML y Rombos: OC.



4.5.13 Efecto del CaCl_2 y MnCl_2 sobre la estabilidad en medio orgánico de las diferentes preparaciones de RML

El efecto estabilizante de los cationes en presencia de solventes orgánicos sobre las preparaciones de RML se muestra en la **figura 58**; en la cual se aprecia que, la adición de sales, mejora significativamente la estabilidad de todos los derivados frente al efecto inactivante del acetonitrilo.

Figura 58. Efecto de los cationes sobre la inactivación en acetonitrilo de las diferentes preparaciones de RML. Los biocatalizadores fueron incubados a 30°C en 25% (v/v) ACN / 5mM TrisHCl a pH 7 conteniendo CaCl_2 (Panel A) o MnCl_2 (Panel B). Línea sólida: preparaciones OCGLX, Línea punteada: preparación OC. Triángulos: OCGLXRML-Ca, Cuadrados: OCGLXRML y Rombos: OC.



La vida media de los derivados OCRML, OCGLXRML y OCGLXRML-Ca en presencia de CaCl_2 fueron 5.8, 8.5 y alrededor de 60 horas, respectivamente. Asimismo, en presencia de MnCl_2 la estabilidad fue un menor, siendo 2.5, 4 y 8.5 horas respectivamente. Los resultados obtenidos sugieren que estas sales pueden ser utilizadas como agentes estabilizantes de la lipasa de *Rhizomucor miehei* frente a cualquier agente inactivante, que pueda causar distorsiones en la enzima y por consiguiente, generar su inactivación. A pesar de la estabilización generada por la sal de Mn, una mejor adsorción del ion Ca^{2+} en las moléculas de enzima inmovilizadas covalentemente y en presencia de este catión es evidente; por lo cual, las moléculas de RML presentan una mayor afinidad por el Ca^{2+} .

4.6 CONCLUSIONES

El uso del soporte octil-glioxil agarosa en la inmovilización de lipasas es mejorado mediante la aminación previa de la enzima y puede ser simplificado, ya que es posible realizar la aminación luego de la inmovilización de la enzima sobre el soporte. Esta estrategia permite obtener rápidamente algunas interacciones entre todas las moléculas de enzima y los grupos glioxil del soporte mediante incubación a pH alcalino, solucionando algunos de los problemas encontrados usando enzimas sin modificar.

La aminación de enzimas por sí sola, puede modificar las propiedades de las lipasas; por tanto, la estrategia propuesta en este estudio puede tener un gran interés en la preparación de lipasas sobre soportes hidrofóbicos, teniendo una ventaja más en la inmovilización-estabilización en un paso y la estabilización de la forma abierta de la lipasa sobre estos tipos de soportes bajo diversas condiciones experimentales.

Uno de los principales problemas en la inmovilización de lipasas sobre el soporte OCGLX es que se requiere, después de la adsorción de la enzima, una posterior incubación a pH 10 para generar interacciones covalentes enzima-soporte. En este estudio, se ha demostrado que el uso de técnicas alternativas para mejorar la estabilidad de las enzimas bajo condiciones alcalinas del medio de inmovilización, como la modificación química y el uso de sales, pueden solventar los problemas durante el uso del nuevo soporte heterofuncional.

El efecto estabilizante del Mn^{2+} y del Ca^{2+} descrito en OCRML, pero no en otras preparaciones de la misma enzima, es observado en las dos preparaciones sobre OCGLX, aunque el efecto es mayor y más claro usando OCGLXRML-Ca, quizás debido a que la presencia del catión durante la inmovilización previene distorsiones de la enzima y mantiene inalterado el mecanismo de estabilización

del catión (Ca^{2+}). Además, el efecto estabilizante encontrado en la inactivación térmica, puede ser extrapolado a la estabilización en presencia de solventes orgánicos, haciendo del uso de sales de calcio y de manganeso una alternativa de estabilización de enzimas en casi cualquier medio de reacción.

5. RECOMENDACIONES

Los estudios de desplegamiento/replegamiento mostraron que existen problemas en ambas etapas, por lo que se requiere su optimización, hasta conseguir que las enzimas puedan desplegarse y replegarse de forma idéntica independientemente de la conformación inicial; mediante la evaluación del efecto de la fuerza iónica, la presencia de detergentes o sales, el pH de replegamiento/desplegamiento, la presencia de agentes reductores, la naturaleza del soporte y modificaciones químicas de las enzimas.

Podrían ser usados diferentes soportes, además de la agarosa, que tuvieran utilidad en medio orgánico. Por ejemplo usando silica, donde además sería posible variar la relación entre los grupos funcionales incorporados en el soporte, cambiando el tipo de grupo acil (butil, fenil, octil, decaoctil, etc) y realizar optimizaciones del soporte para cada enzima.

BIBLIOGRAFÍA

AHMED, M., KELLY, T., y GHANEM, A. Applications of enzymatic and non-enzymatic methods to access enantiomerically pure compounds using kinetic resolution and racemization. *Tetrahedron*. (2012). 68 (34), 6781-6802.

ANDERSON, E., LARSSON, K. y KIRK, O. One Biocatalyst–Many Applications: The Use of *Candida antarctica* B-Lipase in Organic Synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*. (1998). 16 (3), 181-204.

ARNOLD, F.H. y VOLKOV, A.A. Directed evolution of biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*. (1999). 3, 54-59.

BARBOSA, O., ARIZA, C., ORTIZ, C. y TORRES, R. Kinetic resolution of (R/S)-propranolol (1-isopropylamino-3-(1-naphthoxy)-2-propanolol) catalyzed by immobilized preparations of *Candida antarctica* lipase B (CAL-B). *New Biotechnology*. (2010). 27 (6), 844-850.

BARBOSA, O., ORTIZ, C., TORRES, R. y FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica* in organic media: Enantiospecific production of atenolol acetate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2011). 71, 124–132.

BARBOSA, O., TORRES, R., ORTIZ, C. y FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. *Process Biochemistry*. (2012). 47, 1220–1227.

BARBOSA, O., TORRES, R., ORTIZ, C., BERENGUER-MURCIA, A., RODRIGUES, R. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Heterofunctional Supports in Enzyme Immobilization: From Traditional Immobilization Protocols to Opportunities in Tuning Enzyme Properties. *Biomacromolecules*. (2013). 14 (8), 2433-2462.

BASTIDA, A., SABUQUILLO, P., ARMISÉN, P., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., HUGUET, J. y GUIBAN, J.M. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnology and Bioengineering*. (1998). 58, 486-493.

BERNAL, C., ILLANES, A. y WILSON, L. Heterofunctional hydrophilic-hydrophobic porous silica as support for multipoint covalent immobilization of lipases: application to lactulose palmitate synthesis. *Langmuir*. (2014). 30 (12), 3557-3566.

BLANCO, R.M. y GUIBAN, J.M. Protecting effect of competitive inhibitors during very intense insolubilized enzyme-activated support multipoint attachments: trypsin (amine)-agarose (aldehyde) system. *Enzyme and Microbial Technology*. (1998). 10, 227-232.

BOLIVAR, J.M., LÓPEZ-GALLEGO, F., GODOY, C., RODRIGUES, D.S., RODRIGUES, R.C., BATALLA, P., ROCHA-MARTIN, J., MATEO, C., GIORDANO, R.L.C. y GUIBAN, J.M. The presence of thiolated compounds allows the immobilization of enzymes on glyoxyl agarose at mild pH values: New strategies of stabilization by multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology*. (2009). 45, 477-483.

BOLIVAR, J.M., MATEO, C., GODOY, C., PESSELA, B.C.C., RODRIGUES, D.S., GIORDANO, R.L.C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. y GUIBAN, J.M. The co-operative effect of physical and covalent protein adsorption on heterofunctional supports. *Process Biochemistry*. (2009). 44, 757–763.

BOLIVAR, J.M., ROCHA-MARTIN, J., GODOY, C., RODRIGUES, R.C. y GUI SAN, J.M. Complete reactivation of immobilized derivatives of a trimeric glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *Process Biochemistry*. (2010). 45, 107-113.

BORNSCHEUER, U.T. y POHL, M. Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Current Opinion in Chemical Biology*. (2001). 5 (2), 137-143.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. (1976). 72, 248-254.

BRADY, D. y JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilization. *Biotechnology Letters*. (2009). 31, 1639-1650.

BUCHHOLZ, K. Characterization of immobilized biocatalysts. *DECHEMA Monograph*. (1979). 84 (Weinheim: VCH).

BUCHHOLZ, K., KASCHE, V. y BORNSCHEUER, U.T. *Biocatalysts and Enzyme Technology*. Weinheim: Wiley-VCH, (2005).

CANTONE, S., FERRARIO, V., CORICI, L., EBERT, C., FATTOR, D., SPIZZO, P. y GARDOSSI, L. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. (2013). 42, 6262-6276.

CARRASCO-LÓPEZ, C., GODOY, C., DE LAS RIVAS, B., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., PALOMO, J.M., GUI SAN, J.M., FERNANDEZ-LAFUENTE, R.,

MARTÍNEZ-RIPOLL, M. y HERMOSO, J. Activation of bacterial thermo alkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements. *Journal of Biological Chemistry*. (2009). 284, 4365–4372.

CARRAWAY, K.L. y KOSHLAND, Jr. D.E. Reaction of tyrosine residues in proteins with carbodiimide reagents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*. (1968). 160, 272-274.

CARRAWAY, K.L. y KOSHLAND, Jr. D.E. Carbodiimide Modification of Proteins. *Proteins. Methods in Enzymology*. (1972). 439 (1956), 616–623.

CASAS-GODOY, L., DUQUESNE, S., BORDES, F., SANDOVAL, G. y MARTY, A. Lipases: An Overview. *Methods in Molecular Biology*. (2012). 861, 1-30.

COLLINS, K.D. Sticky ions in biological systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (1995). 92, 5553-5557.

CUNHA, A., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., BEVILAQUA, J., DESTAIN, J., PAIVA, L., FREIRE, D., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. y GUISÁN, J.M. Immobilization of *Yarrowia lipolytica* Lipase a Comparison of Stability of Physical Adsorption and Covalent Attachment Techniques. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. (2008). 146 (1-3), 49-56.

DE CORDT, S., AVILA, I., HENDRICKX, M. y TOBBACK, P. DSC and protein-based time-temperature integrators: Case study of α -amylase stabilized by polyols and/or sugar. *Biotechnology and Bioengineering*. (1994). 44, 859-865.

DELORME, V., DHOUIB, R., CANAAN, S., FOTIADU, F., CARRIÈRE, F. y CAVALIER, J.F. Effects of Surfactants on Lipase Structure, Activity, and Inhibition. *Pharmaceutical Research*. (2011). 28 (8), 1831-1842.

DEMIRJIAN, D.C., MORÍS-VARAS, F. y CASSIDY, C.S. Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*. (2001). 5 (2), 144-151.

DEREWENDA, U., BRZOZOWSKI, A.M., LAWSON, D.M. y DEREWENDA, Z.S. Catalysis at the interface - the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry*. (1992). 31 (5), 1532-1541.

DICOSIMO, R., MCAULIFFE, J., POULOSE, A.J. y BOHLMANN, G. Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society Reviews*. (2013). 42, 6437-6474.

DOMÍNGUEZ, P., CARBONI-OERLEMANS, C., TUIN, B., BARGEMAN, G., MEER, A. y GEMERT, R. Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2005). 37, 36-46.

DOMINGUEZ, P., SÁNCHEZ-MONTERO, J., SINISTERRA, J. y ALCÁNTARA, A. Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnology Advances*. (2006). 24, 180-196.

DOS SANTOS, J.C., GARCIA-GALAN, C., RODRIGUES, R.C., DE SANT'ANA, H.B., GONCALVES, L. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improving the catalytic properties of immobilized Lecitase via physical coating with ionic polymers. *Enzyme and Microbial Technology*. (2014). 60, 1–8.

DOS SANTOS, J.C., RUEDA, N., TORRES, R., BARBOSA, O., GONCALVES, L. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Evaluation of divinylsulfone activated agarose to immobilize lipases and to tune their catalytic properties. *Process Biochemistry*. (2015). 50 (6), 918–927.

EIJSSINK, V.G.H., GÅSEIDNES, S., BORCHERT, T.V. y VAN DEN BURG, B. Directed evolution of enzyme stability. *Biomolecular Engineering*. (2005). 22, 21-30.

ERICSSON, D., KASRAYAN, A., JOHANSSON, P., BERGFORS, T., SANDSTROM, A., BACKVALL, J. y MOWBRAY, S. X-ray Structure of *Candida antarctica* Lipase A Shows a Novel Lid Structure and a Likely Mode of Interfacial Activation. *Journal of Molecular Biology*. (2008). 376, 109-119.

ESCORCIA, A., CRUZ, J., TORRES, R. y ORTIZ, C. Kinetic resolution of (R,S)-methyl mandelate by immobilized lipase preparations from *Candida antarctica* B. *Vitae*. (2011). 18 (1), 33-41

FENG, X., PATTERSON, D., BALABAN, M. y EMANUELSSON, E. Enabling the utilization of wool as an enzyme support: Enhancing the activity and stability of lipase immobilized onto woolen cloth. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. (2013). 102, 526-533.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R., ROSELL, C.M., RODRIGUEZ, V., SANTANA, C., SOLER, G., BASTIDA, A. y GUISAN, J.M. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme and Microbial Technology*. (1993). 15, 546-550.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R., ARMISÉN, P., SABUQUILLO, P., FERNÁNDEZ-LORENTE, G. y GUISÁN, J.M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chemistry and Physics of Lipids*. (1998). 93 (1-2), 185-197.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme and Microbial Technology*. (2009). 45, 405-418.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2010). 62, 197–212.

FERNANDEZ-LOPEZ, L., BARTOLOME-CABRERO, R., RODRIGUEZ, M.D., DOS SANTOS, J.C.S., RUEDA, N. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilizing effects of cations on lipases depend on the immobilization protocol. *RSC Advances*. (2015). 5, 83868-83875.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G., PALOMO, J.M., FUENTES, M., MATEO, C., GUISÁN, J.M. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Self-assembly of *Pseudomonas fluorescens* lipase into bimolecular aggregates dramatically affects functional properties. *Biotechnology and Bioengineering*. (2003). 82, 232–237.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G., PALOMO, J.M., MATEO, C., MUNILLA, R., ORTIZ, C., CABRERA, Z. Glutaraldehyde cross-linking of lipases adsorbed on aminated supports in the presence of detergents leads to improved performance. *Biomacromolecules*. (2006). 7, 2610–2615.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G., PALOMO, J.M., CABRERA, Z., GUISÁN, J.M. y FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. *Enzyme and Microbial Technology*. (2007). 41 (5), 565–569.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G., PALOMO, J.M., CABRERA, Z., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. y GUISÁN, J.M. Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium. *Biotechnology and Bioengineering*. (2007). 97, 242–250.

FERNANDEZ-LORENTE, G., GODOY, C.A., MENDES, A.A., LOPEZ-GALLEGO, F., GRAZU, V., DE LAS RIVAS, B., PALOMO, J.M., HERMOSO, J., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. y GUIBAN, J.M. Solid-Phase Chemical Amination of a Lipase from *Bacillus thermocatenulatus* To Improve Its Stabilization via Covalent Immobilization on Highly Activated Glyoxyl-Agarose. *Biomacromolecules*. (2008). 9, 2553-2561.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G., BETANCOR, L., CARRASCOSA, A., PALOMO, J.M. y GUIBAN, J.M. Modulation of the Selectivity of Immobilized Lipases by Chemical and Physical Modifications: Release of Omega-3 Fatty Acids from Fish Oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*. (2011). 88, 819–826.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G., FILICE, M., LOPEZ-VELA, D., PIZARRO, C., WILSON, L., BETANCOR, L., AVILA, Y. y GUIBAN, J.M. Cross-Linking of Lipases Adsorbed on Hydrophobic Supports: Highly Selective Hydrolysis of Fish Oil Catalyzed by RML. *Journal of the American Oil Chemists Society*. (2011). 88, 801-807.

FOE, L.G. y TRUJILLO, J.L. Activation of phosphofructokinase by divalent anions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. (1980). 199, 1-6.

GALVIS, M., BARBOSA, O., TORRES, R., ORTIZ, C. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effect of solid-phase chemical modification on the features of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochemistry*. (2012). 47, 460-466.

GARCIA-GALAN, C., BERENGUER-MURCIA, A., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. y RODRIGUES, E.C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*. (2011). 353, 2885-2904.

GARCIA-GALAN, C., BARBOSA, O. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of the hexameric glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli* by cations and polyethyleneimine. *Enzyme and Microbial Technology*. (2013). 52, 211-217.

GARCIA-GALAN, C., BARBOSA, O., HERNANDEZ, K., DOS SANTOS, J.C.S., RODRIGUES, R.C. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Evaluation of styrene-divinylbenzene beads as a support to immobilize lipases. *Molecules*. (2014). 19, 7629–7645.

GEKKO, K. y KOGA, S. Increased thermal stability of collagen in the presence of sugars and polyols. *Journal of Biochemistry*. (1983). 94, 199-205.

GODOY, C.A., DE LAS RIVAS, B., BEZBRADICA, D., BOLIVAR, J.M., LÓPEZ-GALLEGU, F., FERNANDEZ-LORENTE, G. y GUIBAN, J.M. Reactivation of a thermostable lipase by solid phase unfolding/refolding: Effect of cysteine residues on refolding efficiency. *Enzyme and Microbial Technology*. (2011). 49, 388-394.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V., BRIEVA, R. y GOTOR, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2006). 40, 111–120.

GRAZU, V., BETANCOR, L., MONTES, T., LOPEZ-GALLEGU, F., GUIBAN, J.M. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Glyoxyl agarose as a new chromatographic matrix. *Enzyme and Microbial Technology*. (2006). 38 (7), 960-966.

GROCHULSKI, P., LI, Y., SCHRAGM, J., BOUTTHILIER, F., SMITH, P., HARRINSON, D., RUBIN, B., y CYLER, M. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *Journal of Biological Chemistry*. (1993). 268, 12843–12847.

GUISÁN, J.M. Aldehyde-Agarose Gels as Activated Supports for Immobilisation-Stabilisation of Enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*. (1988). 10, 375-382.

GUISAN, J.M., ALVARO, G., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., ROSELL, C.M., GARCIA, J.L. y TAGLIANI, A. Stabilization of heterodimeric enzyme by multipoint covalent immobilization: Penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*. *Biotechnology and Bioengineering*. (1993). 42, 455-464.

GUISÁN, J.M. Immobilization of enzymes and cells. *Methods in Biotechnology*. Second edition. Humana Press. (2006).

GUTIERREZ, E. Estudio del efecto de los solventes orgánicos sobre la actividad biocatalítica de la cloroperoxidasa. Tesis de grado. Universidad Industrial de Santander (2001).

GUZIK, U., HUPERT-KOCUREK, K. y WOJCIESZYNSKA, D. Immobilization as a Strategy for Improving Enzyme Properties-Application to Oxidoreductases. *Molecules*. (2014). 19, 8995-9018.

HACKING, M., VAN RANTWIJK, F. y SHELDON, R. Lipase catalysed synthesis of diacyl hydrazines: An indirect method for kinetic resolution of chiral acids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2000). 9 (4-6), 183-191.

HATTORI, M., AMETANI, A., KATAKURA, Y., SHIMIZU, M. y KAMINOGAWA, S. Unfolding/Refolding Studies on Bovine β -Lactoglobulin with Monoclonal Antibodies as Probes. does a renatured protein completely refold?. *The journal of biological chemistry*. (1993). 288, 22414-22419.

HELISTO, P. y KORPELA, T. Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method. *Enzyme and Microbial Technology*. (1998). 23, 113–117.

HERMANSON, G.T. Chapter 15 – Immobilization of ligands on Chromatography Supports. *Bioconjugate Techniques*. Third edition. (2013). 589-740.

HERMOSO, J., PIGNOL, D., KERFELEC, B., CRENON, I., CHAPUS, C. y FONTECILLA-CAMPS, J.C. Lipase activation by nonionic detergents. The crystal structure of the porcine lipase-colipase-tetraethylene glycol mono octyl ether complex. *Journal of Biological Chemistry*. (1996). 271, 18007–18016.

HERNANDEZ, K. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase B from *Candida antarctica* immobilized on octadecyl Sepabeads: A very stable biocatalyst in the presence of hydrogen peroxide. *Process Biochemistry*. (2011). 46 (4), 873-878.

HUGE-JENSEN, B., GALLUZO, D.R. y JENSEN, R.G. Partial purification and characterization of free and immobilized lipases from *Mucor miehei*. *Lipids*. (1987). 22, 559-565.

ILLANES, A. *Biotecnología de enzimas*. Ediciones universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Calparaíso. Chile. (1994).

IYER, P.V. y ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*. (2008). 43, 1019-1032.

JAEGER, K.E., DIJKSTRA, B.W. y REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology*. (1999). 53, 315-351.

JAEGER, K.E., RANSAC, S., DIJKSTRA, B.W., COLSON, C., VANHEUVEL, M. y MISSET, O. BACTERIAL LIPASES. *Fems Microbiology Reviews*. (1994). 15 (1), 29-63.

JAEGER, K.E. y EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. (2002). 13 (4), 390-397.

JENSEN, W.A., ARMSTRONG, J.M., SE GIORGIO, J. y HEARN, M.T.W. Stability studies on pig heart mitochondrial malate dehydrogenase: the effect of salts and amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. (1996). 1296, 23-34.

JUTILA, A., ZHU, K., PATKAR, S.A., VIND, J., SVENDSEN, A. y KINNUNEN, P.K. Detergent-induced conformational changes of *Humicola lanuginosa* lipase studied by fluorescence spectroscopy. *Biophysical Journal* (2000). 78,1634–1642.

KARMEE, S.K., CASIRAGHI, L. y GREINER, L. Technical aspects of biocatalysis in non-CO₂-based supercritical fluids. *Biotechnology journal*. (2008). 3 (1), 104-111.

KAPOOR, M. y GUPTA, M.N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*. (2012). 47, 555-569.

KIRK, O. y CHRISTENSEN, M. Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin. *Organic Process Research and Development*. (2002). 6, 446-451.

KOŁODZIEJSKA, R., KARZMARSKA-WÓDZKA, A., WOLAN, A. y DRAMIŃSKI, M. *Candida antarctica* lipase B catalyzed enantioselective acylation of pyrimidine acyclonucleoside. *Biocatalysis and Biotransformation*. (2012). 30 (4), 426-430.

KUCHNER, O. y ARNOLD, F.H. Directed evolution of enzyme catalysts. Trends in Biotechnology. (1997). 15, 523-530.

KUMAR, A. y VENKATESU, P. Overview of the Stability of α -Chymotrypsin in Different Solvent Media. Chemical reviews. (2012). 112, 4283-4307.

KWON, J., KIM, H. y LEE, E.K. In vitro refolding of PEGylated lipase. Journal of Biotechnology. (2007). 131 (2), 177-179.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. (1970). 227, 680-685.

LÓPEZ-BELMONTE, M.T. Estudio de la actividad y enantioselectividad de derivados de la lipasa de *Rhizomucor miehei*. Universidad Complutense, España. (1996).

LÓPEZ-GALLEGU, F., MONTES, T., FUENTES, M., ALONSO, N., GRAZU, V. y BETANCOR L. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. Journal of biotechnology. (2005). 116 (1), 1-10.

LUTZ, S. Engineering lipase B from *Candida antarctica*. Tetrahedron: Asymmetry. (2004). 15, 2743–2748.

MANOEL, E.A., DOS SANTOS, J.C.S., FREIRE, D.M.G., RUEDA, N. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. Enzyme and Microbial Technology. (2015). 71, 53–57.

MARCIELLO, M., FILICE, M. y PALOMO J.M. Different strategies to enhance the activity of lipase catalysts. *Catalysis Science & Technology*. (2012). 2, 1531–1543.

MATEO, C., ABIAN, O., BERNEDO, M., CUENCA, E., FUENTES, M., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., PALOMO, J.M., GRAZU, V., PESSELA, B.C.C., GIACOMINI, C., IRAZOQUI, G., VILLARINO, A., OVSEJEVI, K., BATISTA-VIERA, F., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. y GUIBAN, J.M. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme and Microbial Technology*. (2005). 37, 456-462.

MATEO, C., PALOMO, J.M., FUENTES, M., BETANCOR, L., GRAZU, V., LÓPEZ-GALLEGO, F., PESSELA, B.C.C., HIDALGO, A., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. y GUIBAN, J.M. Glyoxyl agarose: a fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme and Microbial Technology*. (2006). 39, 274-280.

MATEO, C., PALOMO, J.M., FERNANDEZ-LORENTE, G., GUIBAN, J.M. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*. (2007). 40, 1451–1463.

MATEO, C., BOLIVAR, J.M., GODOY, C.A., ROCHA-MARTIN, J., PESSELA, B., CURIEL, J.A., MUÑOZ, R., GUIBAN, J.M. y FERNANDEZ-LORENTE, G. Improvement of Enzyme Properties with a Two-Step Immobilization Process on Novel Heterofunctional Supports. *Biomacromolecules*, (2010). 11, 3112-3117.

MOGENSEN, J.E., SEHGAL, P. y OTZEN, D.E. Activation, inhibition, and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents. *Biochemistry*. (2005). 44, 1719–1730.

MOZHAEV, V.V. y MARTINEK, K. Inactivation and reactivation of proteins (enzymes). *Enzyme and Microbial Technology*. (1982). 4, 299-309.

NEVELL, T.P. Determination of Reducing End-Groups: Oxidation Methods. Chapter 10. (1963). 3, 43-48.

OBÓN, J.M., MANJÓN, A. y IBORRA, J.L. Comparative thermostability of glucose dehydrogenase from *Haloferax mediterranei*. Effects of salts and polyols. *Enzyme and microbial technology*. (1996). 19, 352-360.

ORTEGA, S., MÁXIMO, M., MONTIEL, M., MURCIA, M. y BASTIDA, J. Esterification of polyglycerol with polycondensed ricinoleic acid catalysed by immobilised *Rhizopus oryzae* lipase. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. (2012). Article in Press: 1-12.

ORZÁEZ, M., MORA, P., MONDRAGÓN, L., PÉREZ-PAYÁ, E. y VICENT, M.J. Solid-phase chemistry: A useful tool to discover modulators of protein interactions. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. (2007). 13 (1-2), 281-293.

OTHMAN, S., BASRI, M., HUSSEIN, M., RAHMAN, M., ZALIHA, R. y JASMANI, H. Production of highly enantioselective (–)-menthyl butyrate using *Candida rugosa* lipase immobilized on epoxy-activated supports. *Food Chemistry*. (2008).106 (2), 437-443.

PALOMO, J., FERNANDEZ-LORENTE, G., MATEO, C., ORTIZ, C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. y GUISAN, J.M. Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters. *Enzyme and Microbial Technology*. (2002). 31 (6), 775-783.

PALOMO, J.M., FUENTES, M., FERNANDEZ-LORENTE, G., MATEO, C., GUIBAN, J.M. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules*. (2003). 4, 1-6.

PALOMO, J.M. Lipases Enantioselectivity Alteration by Immobilization Techniques. *Current Bioactive Compounds*. (2003). 4, 126-138.

PALOMO, J.M., ORTIZ, C., FUENTES, M., FERNANDEZ-LORENTE, G., GUIBAN, J.M. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase–lipase interactions. *Journal of Chromatography A*. (2004). 1038 (1-2), 267–273.

PALOMO, J.M., ORTIZ, C., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., FUENTES, M., GUIBAN, J.M. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. *Enzyme and Microbial Technology*. (2005). 36 (4), 447–454.

PALOMO, J. y GUIBAN, J.M. Different strategies for hyperactivation of lipase biocatalysts. *Methods in Molecular Biology*. (2012). 861, 329-341.

PAN, S., LIU, X., XIE, Y., YI, Y., LI, C., YAN, Y. y LIU, Y. Esterification activity and conformation studies of *Burkholderia cepacia* lipase in conventional organic solvents, ionic liquids and their co-solvent mixture media. *Bioresource Technology*. (2010). 101 (24), 9822-9824.

PAVLIDIS, I.V., GOURNIS, D., PAPADOPOULOS, G.K. y STAMATIS, H. Lipases in water-in-ionic liquid microemulsions: Structural and activity studies. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2009). 60 (1-2), 50–56.

PÉREZ, I. y MORENO, V. Acilaciones regioselectivas de oligosacáridos catalizadas por enzimas: caracterización y propiedades de los productos. Universidad de Granada, España. (2006).

PLEISS, J., FISCHER, M. y SCHMID, R.D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chem Phys Lipids*. (1998). 93, 67–80.

POLLARD, A. y WYN, R.G. Enzyme Activities in Concentrated Solutions of Glycinebetaine and Other Solutes. *Planta*. (1979). 144, 291-298.

PRECHTER, A., GRÖGER, H. y HEINRICH, M. Synthesis of (S)-(+)-cericlamine through lipase-catalyzed aminolysis of azo acetates. *Organic & Biomolecular Chemistry*. (2012). 17 (10), 3384-3387.

POLIZZI, K.M., BOMMARIUS, A.S., BROERING, J.M. y CHAPARRO-RIGGERS, J.F. Stability of biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*. (2007). 11 (2), 220-225.

RAY, J., NAGY, Z., SMITH, K., BHAGGAN, K. y STAPLEY, A. Kinetic study of the acidolysis of high oleic sunflower oil with stearic–palmitic acid mixtures catalysed by immobilised *Rhizopus oryzae* lipase. *Biochemical Engineering Journal*. (2013). 73, 17-28.

ROCCHIETTI, S., URRUTIA, A., PREGNOLATO, M., TAGLIANI, A., GUISÁN, J.M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. y TERRENI, M. Influence of the derivative preparation and substrate structure on the enantioselectivity of penicillin G acylase. *Enzyme and Microbial Technology*. (2002). 31, 88-93.

RODRIGUES, R.C., GODOY, C., VOLPATO, G., AYUB, M., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. y GUISAN, J.M. Immobilization–stabilization of the lipase from

Thermomyces lanuginosus: Critical role of chemical amination. *Process Biochemistry*. (2009). 44, 963-968.

RODRIGUES, R.C., BOLIVAR, J.M., PALAU-ORS, A., VOLPATO, G., AYUB, M., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. y GUISAN, J.M. Positive effects of the multipoint covalent immobilization in the reactivation of partially inactivated derivatives of lipase from *thermomyces lanuginosus*. *Enzyme and Microbial Technology*. (2009a). 44, 386-393.

RODRIGUES, R.C., BOLIVAR, J.M., VOLPATO, G., FILICE, M., GODOY, C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. y GUISAN, J.M. Improved reactivation of immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus* by its coating with highly hydrophilic polymers. *Journal of Biotechnology*. (2009b). 144, 113-119.

RODRIGUES, R.C. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2010a). 64, 1-22.

RODRIGUES, R.C. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2010b). 66, 15-32.

RODRIGUES, R., BERENGUER-MURCIA, A. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Coupling Chemical Modification and Immobilization to Improve the Catalytic Performance of Enzymes. *Advanced Synthesis & Catalysis*. (2011). 353, 2216-2238.

RODRIGUES, R., ORTIZ, C., BERENGUER-MURCIA, A., TORRES, R. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*. (2013). 42, 6290-6307.

RODRIGUES, R., BARBOSA, O., ORTIZ, C., BERENGUER-MURCIA, A., TORRES, R. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Amination of enzymes to improve biocatalyst performance: coupling genetic modification and physicochemical tools. RSC Advances. (2014). 4, 38350-38374.

ROMERO, O., GUIBAN, J.M., ILLANES, A. y WILSON, L. Reactivation of penicillin acylase biocatalysts: Effect of the intensity of enzyme–support attachment and enzyme load. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. (2012). 74, 224-229.

ROSELL, C.M., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. y GUIBAN, J.M. Modification of enzyme properties by the use of inhibitors during their stabilization by multipoint covalent attachment. Biocatalysis and Biotransformation. (1995). 12, 67-76.

RUEDA, N., DOS SANTOS, J.C.S., TORRES, R., ORTIZ, C., BARBOSA, O. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improved performance of lipases immobilized on heterofunctional octyl-glyoxyl agarose beads. RSC Advances. (2015). 5, 11212-11222.

RUEDA, N., DOS SANTOS, J.C.S., TORRES, R., ORTIZ, C., BARBOSA, O. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on heterofunctional octyl-glyoxyl agarose supports: Improved stability and prevention of the enzyme desorption. Methods in enzymology. (2015). doi:10.1016/bs.mie.2015.09.035

RUEDA, N., DOS SANTOS, J.C.S., ORTIZ, C., BARBOSA, O., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. y TORRES, R. Chemical amination of lipases improves their immobilization on octyl-glyoxyl agarose beads. Catalysis today. (2016). 259, 107-118.

SABUQUILLO, P., REINA, J., FERNANDEZ-LORENTE, G., GUIBAN, J.M. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Interfacial affinity chromatography of lipases: separation of different fractions by selective adsorption on supports activated with hydrophobic groups. *Biochimica et biophysica acta*. (1998). 1388 (2), 337–348.

SANTANIELLO, E., CASATI, S. y CIUFFREDA, P. Lipase-Catalyzed Deacylation by Alcoholysis: A Selective, Useful transesterification reaction. *Current Organic Chemistry*. (2006). 10 (10), 1095-1123.

SCHMID, R. D. y VERGER, R. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie-International Edition*. (1998). 37 (12), 1609-1633.

SHANDAR, A., GROMIHA, M.M., FAWAREH, H. y SARAI, A. ASAView Database and tool for solvent accessibility representation in proteins. *BMC Bioinformatics*. (2004). 5 [art. 51].

SHELDON, R.A. y VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*. (2013). 42, 6223-6235.

SKJOT, M., DE MARIA, L., CHATTERJEE, R., SVENDSEN, A., PATKAR, S.A., OSTERGAARD, P.R., y BRASK, J. Understanding the Plasticity of the α/β Hydrolase Fold: Lid Swapping on the *Candida antarctica* Lipase B Results in Chimeras with Interesting Biocatalytic Properties. *Chembiochem*. (2009). 10, 520-527.

SRERE, P.A. y UYEDA, K. Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices. Vol XLIV (New York: Academy), (1976).

STEPANKOVA, V., BIDMANOVA, S., KOUDELAKOVA, T., PROKOP, Z., CHALOUPOKOVA, R. y DAMBORSKY, J. Strategies for Stabilization of Enzymes in Organic Solvents. *ACS Catalysis*. (2013). 3, 2823-2836.

SUESCUN, A., RUEDA, N., DOS SANTOS, J.C.S., CASTILLO, J.J., ORTIZ, C., TORRES, R., BARBOSA, O. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on glyoxyl–octyl supports: Improved stability and reactivation strategies. *Process Biochemistry*. (2015). 50, 1211–1217.

TERRENI, M., PAGANI, G., UBIALI, D., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., MATEO, C. y GUISÁN, J.M. Modulation of penicillin acylase properties via immobilization techniques: one-pot chemoenzymatic synthesis of cephamandole from cephalosporin C. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. (2001). 11 (18), 2429-2432.

TISCHER, W. y KASCHE, V. Immobilized enzymes: Crystals or carriers?. *Trends in Biotechnology*. (1999). 17, 326-335.

UPPENBERG, J., HANSEN, M., PATKAR, S. y JONES, A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*. (1994). 2, 34-40.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Trends and biotechnology*. (1997). 15 (1), 32–38.

WANG, J., DO, D., CHUAH, G. y JAENICKE, S. Core-Shell Composite as the Racemization Catalyst in the Dynamic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols. *ChemCatChem*. (2013). 5 (1), 247-254.

WONG, S.S y WONG, L.J.C. Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*. (1992). 14, 866-874.

WRIGHT, D.B., BANKS, D.D., LOHMAN, J.R., HILSENBECK, J.L. y GLOSS, L.M. The effect of salts on the activity and stability of *Escherichia coli* and *Haloferax volcanii* dihydrofolate reductases. *Journal of molecular biology*. (2002). 323, 327-344.

XIONG, J., HUANG, Y. y ZHANG, H. Lipase-catalyzed transesterification synthesis of citronellyl acetate in a solvent-free system and its reaction kinetics. *European Food Research and Technology*. (2012). 235 (5), 907-914.

ZHAO, H. Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity, and its implication for biocatalysis using ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2005). 37, 16-25.

ZISIS, T., FREDDOLINO, P., TURUNEN, P., TEESELING, M., ROWAN, A. y BLANK, K. Interfacial activation of *Candida Antarctica* lipase B: combined evidence from experiment and simulation. *Biochemistry*. (2015). 54 (38), 5969–5979.

ZOLDAK, G., SPRINZL, M. y SEDLAK, E. Modulation of activity of NADH oxidase from *Thermus thermophilus* through change in flexibility in the enzyme active site induced by Hofmeister series anions. *European Journal of Biochemistry*. (2004). 271, 48-57.

ANEXOS

ANEXO A. Determinación de la actividad enzimática

$$\text{Actividad específica (U/g)} = m \frac{10^6}{\varepsilon} * \frac{V_t}{V_m} * \frac{FD}{C_{prot}}$$

Donde:

m = pendiente (mol/L.min)

ε = coeficiente de extinción molar del p-NPB ($5150 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

V_t = Volumen total de la reacción

V_m = Volumen de la solución enzimática

FD = Factor de dilución enzimático

C_{prot} = concentración de proteína en la solución enzimática

U = cantidad de enzima necesaria para hidrolizar un mol de p-NPB a 25°C

DIVULGACIÓN

Artículos científicos:

RUEDA, N., DOS SANTOS, J.C.S., TORRES, R., ORTIZ, C., BARBOSA, O. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improved performance of lipases immobilized on heterofunctional octyl-glyoxyl agarose beads. RSC Advances. (2015). 15, 11212-11222.

RUEDA, N., DOS SANTOS, J.C.S., TORRES, R., BARBOSA, O., ORTIZ, C. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Reactivation of lipases by the unfolding and refolding of covalently immobilized biocatalysts. RSC Advances. (2015). 5, 55588-55594.

RUEDA, N., DOS SANTOS, J.C.S., ORTIZ, C., BARBOSA, O., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. y TORRES, R. Chemical amination of lipases improves their immobilization on octyl-glyoxyl agarose beads. Catalysis Today. (2016). 259, 107-118.

RUEDA, N., FERNANDEZ-LOPEZ, L., BARTOLOME-CABRERO, R., RODRIGUEZ, M.D., ALBUQUERQUE, T.L., DOS SANTOS, J.C.S., BARBOSA, O. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improved immobilization and stabilization of lipase from *Rhizomucor miehei* on octyl-glyoxyl agarose beads by using CaCl_2 . Process Biochemistry. (2015). 51 (1), 48-52.

RUEDA, N., DOS SANTOS, J.C.S., TORRES, R., ORTIZ, C., BARBOSA, O. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of Lipases on Heterofunctional Octyl-Glyoxyl Agarose Supports: Improved Stability and Prevention of the Enzyme Desorption. Methods in Enzymology. (2016). 571, 73-85.

SUESCUN, A., RUEDA, N., DOS SANTOS, J.C.S., CASTILLO, J.J., ORTIZ, C., TORRES, R., BARBOSA, O. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on glyoxyl–octyl supports: Improved stability and reactivation strategies. *Process Biochemistry*. (2015). 50 (8), 1211-1217.

FERNANDEZ-LOPEZ, L., RUEDA, N., BARTOLOME-CABRERO, R., RODRIGUEZ, M.D., ALBUQUERQUE, T.L., DOS SANTOS, J.C.S., BARBOSA, O. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improved immobilization and stabilization of lipase from *Rhizomucor miehei* on octyl-glyoxyl agarose beads by using CaCl_2 . *Process Biochemistry*. (2016). 51, 48-52.

MANOEL, E.A., DOS SANTOS, J.C.S., FREIRE, D.M.G., RUEDA, N. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*. (2015). 71, 53–57.

FERNANDEZ-LOPEZ, L., BARTOLOME-CABRERO, R., RODRIGUEZ, M.D., DOS SANTOS, J.C.S., RUEDA, N. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilizing effects of cations on lipases depend on the immobilization protocol. *RSC Advances*. (2015). 5, 83868–83875.

RUEDA, N., ALBUQUERQUE, T.L., BARTOLOME-CABRERO, R., FERNANDEZ-LOPEZ, L., TORRES R., ORTIZ, C., DOS SANTOS, J.C.S., BARBOSA, O. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Reversible Immobilization of Lipases on Heterofunctional Octyl-Amino Agarose Beads Prevents Enzyme Desorption. *Molecules*. (2016). 21, 646.

RUEDA, N., DOS SANTOS, J.C.S., RODRIGUEZ, M.D., ALBUQUERQUE, T.L., BARBOSA, O., TORRES R., ORTIZ, C. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R.

Reversible immobilization of lipases on octyl-glutamic agarose beads: A mixed adsorption that reinforces enzyme immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2016). 128, 10-18.

ALBUQUERQUE, T.L., RUEDA, N., DOS SANTOS, J.C.S., BARBOSA, O., ORTIZ, C., BINAY, B., OZDEMIR, E., GONCALVES, L.R.B. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Easy stabilization of interfacially activated lipases using heterofunctional divinyl sulfone activated-octyl agarose beads. Modulation of the immobilized enzymes by altering their nanoenvironment. *Process Biochemistry*. (2016). doi:10.1016/j.procbio.2016.04.002

Participación en Congresos:

RUEDA, N., DOS SANTOS, J.C.S., TORRES, R., ORTIZ, C., BARBOSA, O. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipases immobilization on heterofunctional octyl-glyoxyl agarose beads: stabilization and prevention of enzyme release during operation. 3rd International Symposium on Green Chemistry. La Rochelle, Francia, (2015). Poster.

FERNANDEZ-LOPEZ, L., BARTOLOME-CABRERO, R., RUEDA, N., RODRIGUEZ, M.D., ALBUQUERQUE, T.L., DOS SANTOS, J.C.S., BARBOSA, O. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization by Cations of Hydrophobically Immobilized Lipases. 11th International Conference on Protein Stabilisation. Estambul, Turquía, (2016). Poster.

RUEDA, N., ALBUQUERQUE, T.L., DOS SANTOS, J.C.S., BARBOSA, O., TORRES, R., ORTIZ, C. y FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Use of Heterofunctional Octyl Agarose Supports for the One Step Purification, Immobilization and Stabilisation of Lipases. 11th International Conference on Protein Stabilisation. Estambul, Turquía, (2016). Ponencia Oral.