

**OBTENCIÓN DE NUEVOS DERIVADOS DE LIPASA B DE *Candida antarctica*
(CALB) POR TÉCNICAS DE MODIFICACIÓN QUÍMICO-ESTRUCTURAL EN
FASE SÓLIDA**

M.Sc. LUIS OVEIMAR BARBOSA JAIMES

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

2013

**OBTENCIÓN DE NUEVOS DERIVADOS DE LIPASA B DE *Candida antarctica*
(CALB) POR TÉCNICAS DE MODIFICACIÓN QUÍMICO-ESTRUCTURAL EN
FASE SÓLIDA**

M.Sc. LUIS OVEIMAR BARBOSA JAIMES

Trabajo de grado para optar al título de Doctor en Química

Director:

RODRIGO GONZALO TORRES SAEZ, Ph.D

Codirectores:

CLAUDIA CRISTINA ORTIZ LÓPEZ, Ph.D

ROBERTO FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Ph.D

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

DOCTORADO EN QUÍMICA

BUCARAMANGA

2013

DEDICADATORIA:

A mis padres por su apoyo incondicional y su continua voz de aliento

A mis hermanas por su cariño y comprensión

A mi sobrina Valentina por alegrar nuestras vidas

*“En el fondo, los científicos somos gente con suerte: podemos jugar a lo que
queramos durante toda la vida”.*

Lee Smolin

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer profundamente a todas las personas que de una u otra manera fueron parte vital para cumplir una nueva meta en mi vida.

A mis padres, hermanas y familia por todo el apoyo brindado, por las palabras de aliento en los buenos momentos y sobre todo en los malos.

A los doctores Rodrigo Torres y Claudia Ortiz, por sus enseñanzas, paciencia y asesorías en el desarrollo de este trabajo de investigación. Gracias por tanta confianza brindada, por hacerme casi que parte de su familia.

Al doctor Roberto Fernandez Lafuente, por su dirección, orientación y consejos, fue una experiencia altamente enriquecedora el tiempo trabajado en Madrid.

A mis compañeros y amigos del grupo de investigación en Bioquímica, por su apoyo en muchas actividades de esta tesis doctoral, además de hacer divertidas las largas jornadas de trabajo.

A los amigos de siempre, Nazzoly, Nando, Nelson, John, Yeni well, Mario, Marlon, Zayda, y muchos más.

A los profesores Enrique Mejia, Herminsul Cano, Alirio Palma, Estelia Carolina, Jony Duque, por que siempre me brindaron su amistad.

A Colciencias, por la beca Apoyo a doctorados Nacionales.

CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	26
1.1 LIPASAS	26
1.1.1 Generalidades.	26
1.1.2 Estructura de las lipasas.	27
1.1.3 Mecanismo de acción de lipasas.	30
1.1.4. Mecanismo catalítico de las lipasas en solventes orgánicos.	32
1.1.5 Lipasa B de Candida antarctica (CALB).	33
1.1.6 Modulación de las propiedades catalíticas de las lipasas.	34
1.1.6.1 Ingeniería del medio de reacción.	35
1.1.6.2 Ingeniería del derivado.	37
1.1.7 Obtención de biocatalizadores lipásicos con distinta orientación utilizando diferentes estrategias de inmovilización.	41
1.1.7.1 Inmovilización de lipasas sobre estructuras hidrofóbicas.	41
1.1.7.2. Inmovilización de lipasas por intercambio iónico.	43
1.1.7.3. Inmovilización covalente de lipasas sobre el soporte Bromuro de Cianógeno Agarosa (BrCN).	44
1.1.8. Modificación química de proteínas.	44
1.1.9 Resolución cinética catalizada por lipasas.	48
2. MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE CALB POR MODIFICACIÓN EN FASE SÓLIDA CON ÁCIDO TRINITRO-BENCENSULFONICO (TNBS) Y ETILENDIAMINA (EDA)	52
2.1 INTRODUCCIÓN	52
2.1.1 Aminación química de grupos carboxilo con etilendiamina (EDA).	52
2.1.2 Modificación con ácido (2, 3, 4)- trinitro-bencen-sulfónico (TNBS).	53

2.2 MATERIALES	55
2.3 MÉTODOS EXPERIMENTALES	55
2.3.1 Inmovilización de la CALB sobre diferentes soportes	56
2.3.1.1 Inmovilización y purificación de CALB por adsorción hidrofóbica sobre Octil-agarosa (OC).	56
2.3.1.2 Inmovilización de CALB sobre el soporte Bromuro de Cianógeno agarosa (BrCN).	57
2.3.2 Modificación química en fase sólida de CALB con EDA y TNBS	57
2.3.2.1 Aminación en fase sólida de CALB.	57
2.3.2.2 Modificación de grupos amino primarios de CALB con TNBS.	58
2.3.3 Evaluación de la estabilidad de los derivados CALB obtenidos mediante modificaciones secuenciales con EDA y TNBS en fase sólida.	59
2.3.3.1 Estabilidad térmica.	59
2.3.3.2 Estabilidad en presencia de dioxano.	60
2.3.4 Desorción de CALB del soporte OC.	60
2.3.5 Evaluación de la Enantioespecificidad de los diferentes derivados de CALB en la reacción de hidrólisis de R y S-mandelato de metilo.	61
2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	61
2.4.1 Estudio bioinformático de accesibilidad de los solventes a los aminoácidos de CALB susceptibles a modificación química.	61
2.4.2 Determinación de la actividad enzimática frente al p-nitrofenil-butirato (p-NPB).	62
2.4.3 Determinación del grado de modificación de grupos carboxilo.	62
2.4.4 Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes (nativa-PAGE).	63
2.4.5 Determinación del punto isoeléctrico de los derivados modificados de CALB.	63
2.4.5.1 Desorción de derivados de CALB modificados con EDA y TNBS del soporte Octil-agarosa.	63
2.4.5.2 Remoción de sales y tritón X-100 de las preparaciones solubles de CALB modificadas con EDA y TNBS.	64

2.4.5.3 Electroforesis en dos dimensiones y tinción.	64
2.4.5.4 Análisis de imagen de los geles obtenidos.	65
2.4.6 Determinación del grado de hidrólisis en la reacción de R y S-mandelato de metilo mediante HPLC.	65
2.4.7 Determinación del exceso enantiomérico (ee) y la Enantioselectividad (E) de una reacción irreversible.	66
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
2.5.1 Estudio bioinformático de accesibilidad de EDA y TNBS a los aminoácidos de CALB susceptibles a modificación química.	67
2.5.2 Inmovilización de CALB en el soporte OC y BrCN-agarosa.	69
2.5.2.1 Purificación e Inmovilización de CALB en OC.	69
2.5.2.2 Inmovilización de CALB en el soporte BrCN-agarosa.	71
2.5.3 Estabilidad térmica y efecto del pH sobre la actividad enzimática de los derivados OC-CALB, BrCN-CALB.	72
2.5.4 Efecto de la modificación química con EDA y TNBS sobre la actividad de CALB inmovilizada sobre OC y BrCN frente al p-NPB.	74
2.5.5 Efecto del pH sobre la actividad hidrolítica de los derivados OC-CALB modificados con TNBS y EDA frente al p-NPB.	77
2.5.6 Estabilidad de los derivados de OC-CALB modificados con TNBS y EDA	80
2.5.6.1 Efecto de las modificaciones químicas con EDA y TNBS sobre la estabilidad térmica de los derivados de OC-CALB.	80
2.5.6.2 Estabilidad de los diferentes derivados modificados de OC-CALB en presencia de dioxano 50% (v/v).	81
2.5.6.3 Estudio de la fuerza de adsorción de la enzima modificada sobre el soporte.	83
2.5.7 Estudios electroforéticos de los diferentes derivados modificados de CALB.	85
2.5.8 Especificidad y enantioselectividad de los derivados de OC-CALB modificados con EDA y TNBS	87

2.5.8.1 Efecto de las modificaciones químicas sobre la especificidad de los derivados de OC-CALB en la hidrólisis del mandelato de metilo.	87
2.5.8.2 Enantioselectividad de los diferentes derivados de CAL-B catalizando la hidrólisis de R y S-mandelato de metilo.	89
2.6 CONCLUSIONES	92
3. MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOCATALÍTICAS DE CALB MEDIANTE MODIFICACIÓN DE LA DENSIDAD DE CARGA SUPERFICIAL	95
3.1 INTRODUCCIÓN	95
3.2 MATERIALES	97
3.3 MÉTODOS EXPERIMENTALES	97
3.3.1 Inmovilización de la CALB sobre diferentes soportes	99
3.3.1.1 Inmovilización de CALB por adsorción hidrofóbica sobre Octil-agarosa (OC).	99
3.3.1.2 Inmovilización covalente de CALB en el soporte Eupergit C.	99
3.3.1.2.1. Purificación de la CALB.	99
3.3.1.2.2 Inmovilización de CALB en Eupergit C.	100
3.3.2 Modificación química en fase sólida de la superficie enzimática de CALB	100
3.3.2.1 Aminación de los derivados de CALB inmovilizados en Octil-agarosa (OC-CALB) y en Eupergit C (EC-CALB).	100
3.3.2.2 Carboxilación de grupos amino de los derivados de CALB inmovilizados en Octil-agarosa (OC-CALB) y en Eupergit C (EC-CALB) con anhídrido succínico.	101
3.3.3 Evaluación de la estabilidad de los derivados aminados y succinilados de OC-CALB.	101
3.3.3.1 Estabilidad térmica.	102
3.3.3.2 Estabilidad frente a Tetrahidrofurano.	102
3.3.4 Estudio del efecto de la aminación química en los derivados OC-CALB y EC-CALB frente a la actividad hidrolítica del pNPB.	102

3.3.5 Evaluación de la especificidad y enantioselectividad de los derivados modificados de CALB.	102
3.3.6 Estudio del efecto de la modificación química de los derivados EC-CALB y OC-CALB, sobre la hidrólisis enantioselectiva del (R/S) mandelato de metilo.	102
3.3.7 Estudio del efecto de la modificación química de los derivados EC-CALB, sobre la trans-esterificación enantioselectiva de (R/S)-propanolol y (R/S)-atenolol.	103
3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	104
3.4.1 Determinación estándar de la actividad enzimática frente al p-nitrofenilbutirato (p-NPB).	104
3.4.2 Determinación del grado de modificación de los grupos amino y carboxilo de CALB.	104
3.4.3 Estudios electroforéticos de los derivados modificados de CALB	105
3.4.3.1 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).	105
3.4.3.2 Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes (nativa-PAGE).	105
3.4.4 Determinación del exceso enantiomérico (ee_s y ee_p) y de la enantioselectividad (E) de una reacción reversible.	105
3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	106
3.5.1 Inmovilización de CALB por adsorción hidrofóbica sobre octil-agarosa.	106
3.5.2 Modificación química en fase sólida de la superficie enzimática de CALB.	106
3.5.2.1 Modificación química de los grupos amino del derivado OC-CALB con anhídrido succínico.	108
3.5.2.1.1 Control del grado de succinilación química.	108
3.5.2.1.2 Caracterización electroforética de los derivados de OC-CALB succinilados.	110
3.5.2.1.3 Efecto de la succinilación en la actividad hidrolítica de los derivados modificados de OC-CALB frente al p-NPB.	111
3.5.2.1.4 Efecto de la succinilación en la estabilidad térmica y frente a codisolventes de los derivados modificados de OC-CALB	112

3.5.2.2 Modificación química de los grupos carboxilo del derivado OC-CALB con etilendiamina.	114
3.5.2.2.1 Caracterización electroforética de los derivados OC-CALB aminados en fase sólida.	116
3.5.2.2.2 Efecto de la aminación en la actividad hidrolítica de los derivados OC-CALB frente al p-NPB.	118
3.5.2.2.3 Efecto de la aminación en la estabilidad térmica y frente a solventes de los derivados OC-CALB	119
3.5.3 Influencia de la naturaleza del soporte de inmovilización sobre el efecto de la modificación de CALB con EDA y anhídrido succínico.	122
3.5.3.1 Inmovilización covalente de CALB sobre el soporte Eupergit C (EC).	122
3.5.3.2 Hidrólisis enantioselectiva del (R/S) mandelato de metilo catalizada por lo derivados de OC-CALB y EC-CALB aminados y succinilados.	124
3.5.4 Transesterificación enantioselectiva del (R/S) propanolol y (R/S)-atenolol catalizada por lo derivados de EC-CALB aminados y succinilados.	127
3.5.4.1 Transesterificación enzimática del (R/S)-Propanolol.	127
3.5.4.2 Transesterificación enzimática del (R/S)-Atenolol.	129
3.6 CONCLUSIONES	131
4. MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE LA CALB POR MODIFICACIÓN EN FASE SÓLIDA CON m-POLIETILENGLICOL SUCCÍNICO	134
4.1 INTRODUCCIÓN	134
4.2 MATERIALES	138
4.3 MÉTODOS EXPERIMENTALES	138
4.3.1 Inmovilización de CALB sobre diferentes soportes.	139
4.3.1.1 Inmovilización de CALB por adsorción hidrofóbica sobre Octil-agarosa (OC).	139
4.3.1.2 Inmovilización de CALB en Eupergit C.	140

4.3.2 Modificación de OC-CALB y EC-CALB con Etilendiamina (EDA) y con mono-metoxi polietilenglicol succínico (m-PEG-COOH).	141
4.3.2.1 Aminación de los derivados OC-CALB y EC-CALB.	141
4.3.2.2 Modificación de los derivados OC-CALB, OC-CALB-EDA, EC-CALB y EC-CALB-EDA con m-PEG-COOH.	142
4.3.2.2.1 Preparación de mPEG-COOH.	142
4.3.2.2.2 Modificación de OC-CALB, OC-CALB-EDA, EC-CALB y EC-CALB-EDA con m-PEG-COOH.	142
4.3.3 Efecto de la modificación de los derivados OC-CALB y EC-CALB con EDA y PEG sobre la actividad enzimática frente al p-NPB.	143
4.3.4 Evaluación de la estabilidad de los derivados de OC-CALB modificados con EDA y PEG.	143
4.3.4.1 Estabilidad térmica.	143
4.3.4.2 Estabilidad frente a THF.	143
4.3.5 Evaluación de la especificidad y enantioselectividad de los derivados modificados de la CALB.	144
4.3.5.1 Estudio del efecto de la modificación química de los derivados EC-CALB y OC-CALB con EDA y PEG sobre la hidrólisis enantioselectiva del (R/S) mandelato de metilo	144
4.3.5.2 Estudio del efecto de la modificación química de los derivados EC-CALB, sobre la trans-esterificación enantioselectiva de (R/S)-propanolol y (R/S)-atenolol.	144
4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	145
4.4.1 Determinación estándar de la actividad enzimática frente al p-nitrofenilbutirato (p-NPB).	145
4.4.2 Determinación del grado de modificación.	146
4.4.3 Estudios electroforéticos de los derivados modificados de CALB	146
4.4.3.1 Electroforesis en condiciones desnaturizantes.	146
4.4.3.2 Electroforesis en condiciones no desnaturizantes (nativa-PAGE).	146

4.4.4 Determinación del exceso enantiomérico (ees y eep) y de la enantioselectividad (E) de una reacción reversible.	147
4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	147
4.5.1 Inmovilización de CALB en Octil-agarosa.	147
4.5.2 Modificación del derivado OC-CALB con Etilendiamina (EDA) y con mono-metoxi polietilenglicol succínico (m-PEG-COOH).	147
4.5.2.1 Caracterización electroforética de los derivados de OC-CALB modificados con EDA y Mpeg.	150
4.5.3 Efecto de la modificación del derivado OC-CALB con EDA y mPEG sobre la actividad enzimática frente al p-NPB.	151
4.5.4 Efecto de la modificación de OC-CALB con EDA y mPEG en la estabilidad térmica y frente a THF.	152
4.5.5 Influencia de la naturaleza del soporte de inmovilización sobre el efecto final de la modificación de CALB con EDA y PEG.	154
4.5.5.1 Inmovilización covalente de CALB sobre el soporte Eupergit C (EC).	155
4.5.5.2 Hidrólisis enantioselectiva del (R/S) mandelato de metilo catalizada por lo derivados OC-CALB-EDA, OC-CALB-EDA-PEG y EC-CALB-EDA, EC-CALB-EDA-PEG.	155
4.5.6 Transesterificación enantioselectiva del (R/S) propanolol y (R/S)-atenolol catalizada por lo derivados de EC-CALB aminados y PEGilados.	157
4.5.6.1 Transesterificación enzimática de (R/S)-Atenolol.	158
4.5.6.2 Transesterificación enzimática de (R/S)-propanolol.	159
4.6 CONCLUSIONES	161
5. MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOCATALÍTICAS DE CALB MEDIANTE ENTRECruzAMIENTO INTER E INTRAMOLECULAR CON GLUTARALDEHÍDO	163
5.1 INTRODUCCIÓN	163
5.2 MATERIALES	165
5.3 MÉTODOS EXPERIMENTALES	166

5.3.1 Inmovilización de CALB por adsorción hidrofóbica sobre Octil-agarosa (OC).	167
5.3.1.1 Inmovilización de CALB en Octil-agarosa (Bastidas y col., 1998).	167
5.3.1.2 Inmovilización de CALB en Octil-agarosa en presencia de etanol.	167
5.3.2 Modificación parcial y masiva de los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído.	167
5.3.2.1 Modificación del 25% de los residuos lisínicos de los derivados OCC-CALB y OCE-CALB con glutaraldehído.	168
5.3.2.2 Modificación del 50% de los residuos de lisina de los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído.	168
5.3.2.3 Modificación masiva de OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído (Fernández-Lafuente y Col., 1995).	169
5.3.3 Efecto del pH sobre la Actividad enzimática de los derivados OCC-CALB y OCE-CALB modificados con glutaraldehído frente a la hidrólisis de p-nitrofenil-butirato (p-NPB).	169
5.3.4 Evaluación de la estabilidad de los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E modificados con glutaraldehído al 25%, 50% y 100%	170
5.3.4.1 Estabilidad térmica.	170
5.3.4.2 Estabilidad en presencia de dimetil-sulfóxido (DMSO).	170
5.3.5 Desorción de CALB del soporte Octil-agarosa.	171
5.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	171
5.4.1 Determinación estándar de la actividad enzimática frente al p-nitrofenil-butirato (p-NPB).	171
5.4.2 Determinación del grado de modificación de los grupos amino de CALB.	172
5.4.3 Estudios electroforéticos de los derivados modificados de CALB	172
5.4.3.1 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes.	172
5.4.3.2 Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes (nativa-PAGE).	172
5.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	173
5.5.1 Inmovilización de CALB por adsorción hidrofóbica sobre Octil-agarosa (OC).	173

5.5.1.1	Inmovilización convencional de CALB en Octil-agarosa.	174
5.5.1.2	Inmovilización de CALB sobre Octil-agarosa en presencia de Etanol. Efecto de la concentración de etanol sobre la velocidad de inmovilización.	174
5.5.2	Modificación parcial y masiva de los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído	177
5.5.2.1	Modificación de OC-CALB-C con glutaraldehído.	177
5.5.2.2	Modificación de OC-CALB-E con glutaraldehído.	178
5.5.3	Caracterización electroforética de los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E modificados al 25%, 50% y 100% con glutaraldehído.	180
5.5.4	Efecto de la modificación controlada de los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído sobre la fuerza de adsorción enzima-soporte.	183
5.5.5	Efecto de la modificación de los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído sobre la actividad enzimática frente al pNPB.	184
5.5.6	Efecto del pH sobre la actividad enzimática de los derivados OC-CALB-C-GLU y OC-CALB-E-GLU frente al pNPB.	186
5.5.7	Estabilidad de los derivados de OC-CALB-C y OC-CALB-E modificados con glutaraldehídos	189
5.5.7.1	Estabilidad térmica de los derivados OC-CALB-C-GLU y OC-CALB-E-GLU a pH 5, 7 y 9.	189
5.5.7.2	Estabilidad de los derivados OC-CALB-C-GLU y OC-CALB-E-GLU en presencia de DMSO (50% v/v) a pH 7 y 50°C.	191
5.6	CONCLUSIONES	193
	BIBLIOGRAFIA	197
	ANEXOS	220

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Función biológica de las lipasas. Hidrólisis de triglicéridos.	26
Figura 2. Reacciones catalizadas por lipasas.	27
Figura 3. Conformaciones estructurales de la lipasa B de Candida antarctica.	28
Figura 4. Activación interfacial de lipasas con interfases hidrofóbicas.	31
Figura 5. Equilibrio conformacional de lipasas en medios acuosos homogéneos	31
Figura 6. Mecanismo catalítico de lipasas.	33
Figura 7. Estructura Lipasa B de Candida antarctica.	34
Figura 8. Efecto de las condiciones experimentales en el mecanismo de apertura y cierre de la lipasa.	36
Figura 9. Modulación de las propiedades catalítica a través de la Ingeniería del derivado.	38
Figura 10. Adsorción de lipasas sobre estructuras hidrofóbicas.	42
Figura 11. Adsorción iónica de lipasas sobre soportes iónicos mono-amino-etil-N-amino-etil agarosa (MANAE) y Dietil-amino-etil agarosa (DEAE).	43
Figura 12. Inmovilización de lipasas sobre BrCN-agarosa.	44
Figura 13. Estrategias de modificación química de enzimas en fase sólida.	48
Figura 15. Aminación química de los grupos carboxilo de la superficie enzimática de CALB	53
Figura 16. Modificación de los grupos amino primarios de la CALB con TNBS.	55
Figura 17. Metodología propuesta para el estudio de la modificación en fase sólida por aminación y TNBS.	56
Figura 18. Derivados de CALB obtenidos a través de modificaciones secuenciales con EDA y TNBS en fase sólida.	59
Figura 19. Análisis de accesibilidad del solvente (ASA) para los diferentes aminoácidos de CALB (código PDB 1TCA).	68

Figura 20. Modelo de estructura 3D de la superficie de CALB indicando los residuos lisínicos, los ácidos carboxílicos y las argininas.	69
Figura 21. Electroforesis SDS-PAGE del preparado crudo y purificado de CAL-B.	70
Figura 22. Curso de inmovilización de la CALB sobre soportes de Octil agarosa.	71
Figura 23. Curso de inmovilización de la CALB sobre el soporte de BrCN-agarosa.	72
Figura 24. Cursos de inactivación térmica (A) y perfil pH/Actividad (B) para los derivados de CALB.	74
Figura 25. Influencia del valor del pH sobre la actividad de los diferentes derivados modificados de OC-CALB.	79
Figura 26. Perfil de desorción de las preparaciones modificadas de CALB del soporte Octil-agarosa.	84
Figura 27. Electroforesis nativa de los diferentes derivados modificados de CALB.	86
Figura 28. Aminación de grupos carboxilos previamente activados con carbodiimida de la CALB inmovilizada sobre octil-agarosa.	96
Figura 29. Metodología general propuesta para el estudio de la modificación parcial y total de la CALB con etilendiamina.	98
Figura 30. Número de residuos ionizables susceptibles a ser modificados en la CALB.	107
Figura 31. Electroforesis SDS-PAGE de los derivados de OC-CALB succinilados.	110
Figura 32. Electroforesis PAGE-nativa de los derivados de OC-CALB succinilados.	111
Figura 33. Cursos de inactivación térmica para los diferentes derivados succinilados de CALB.	113
Figura 34. Caracterización electroforética de los derivados de OC-CALB aminados.	117

Figura 35. Cursos de inactivación térmica para los diferentes derivados succinilados de CALB.	120
Figura 36. Curso de inmovilización de la CALB en EC.	124
Figura 37. Efecto de la naturaleza del soporte y la modificación química con EDA y anhídrido succínico sobre la actividad de la CALB	125
Figura 38. Resolución cinética de (R/S)-propranolol catalizada por los derivados modificados de EC-CALB.	128
Figura 39. Resolución cinética de (R/S)-Atenolol catalizada por los derivados modificados de EC-CALB.	130
Figura 40. Modificación de enzimas con mPEG. A) Activación de PEG con anhídrido succínico. B) Modificación de CALB con mPEG-succínico.	135
Figura 41. Metodología general realizada para la modificación de la CALB con PEG.	139
Figura 42. Representación esquemática de la estrategia utilizada para la modificación masiva de la superficie del derivado OC-CALB.	149
Figura 43. Efecto de la modificación en fase sólida de CALB con PEG sobre la movilidad electroforética de la enzima.	151
Figura 44. Cursos de inactivación térmica de los derivados de OC-CALB modificados con EDA y PEG.	153
Figura 45. Cursos de inactivación de los derivados de OC-CALB modificados con EDA y PEG,	154
Figura 48. Efecto de la velocidad de inmovilización enzima-soporte sobre la distribución de la enzima en los poros del soporte.	173
Figura 49. Estabilidad de CALB soluble en presencia de diferentes solventes orgánicos.	175
Figura 50. Efecto de la concentración de etanol sobre la velocidad de inmovilización de CALB en octil agarosa	176
Figura 51. Electroforesis SDS-PAGE de los derivados OC-CALB-E obtenidos en presencia de diferentes concentraciones de etanol y posteriormente modificados masivamente con glutaraldehído.	179

Figura 52. Electroforesis SDS-PAGE de los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E modificados al 25%, 50% y 100% con glutaraldehído.	181
Figura 53. Efecto de la modificación de OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído sobre el tipo de entrecruzamiento proteico.	182
Figura 54. Electroforesis Page-nativa de los derivados OC-CALB-E-GLU.	183
Figura 55. Perfil de desorción de los derivados OC-CALB-C-GLU y OC-CALB-E-GLU del soporte Octil-agarosa.	184
Figura 56. Influencia del valor del pH sobre la actividad de los diferentes derivados modificados de OC-CALB	188
Figura 57. Modelo de estructura de superficie 3D de CALB indicando los grupos amino (color rojo) y la distancia entre los grupos más cercanos.	191

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Actividad relativa de los diferentes derivados de CALB modificados con TNBS y EDA en la hidrólisis de pNPB (0.4 mM) a pH 7 y 25°C. 100%	77
Tabla 2. Tiempos de vida media (horas) de los diferentes derivados modificados de OC-CALB bajo diferentes condiciones de inactivación térmica.	81
Tabla 3. Tiempos de vida media (horas) de los diferentes derivados modificados de OC-CALB en presencia de Dioxano 50% (v/v) a diferentes valores de pH.	82
Tabla 4. Puntos isoeléctricos de las diferentes preparaciones modificadas de CALB.	86
Tabla 5. Actividad de las diferentes preparaciones de OC-CALB en la hidrólisis del R-Mandelato de metilo, 10 mM a pH 7 y 25°C.	87
Tabla 6. Enantioselectividad de los derivados modificados de CALB en la hidrólisis del R y S-mandelato de metilo 10 mM, bajo diferentes condiciones experimentales.	91
Tabla 7. Grado de modificación de los grupos amino de las lisinas de CALB inmovilizada sobre octil agarosa y después succinilada.	109
Tabla 8. Efecto del grado de modificación con anhídrido succínico sobre la actividad enzimática de los derivados de OC-CALB frente al p-NPB.	112
Tabla 9. Tiempos de vida media (horas) de los diferentes derivados modificados de OC-CALB en presencia de tetrahidrofurano 50% v/v a pH 7.	114
Tabla 10. Concentraciones de EDAC para el control del grado de modificación de los grupos carboxilo de la CALB inmovilizada sobre octil agarosa.	115
Tabla 11. Efecto del grado de modificación con EDA sobre la actividad relativa de los derivados de OC-CALB frente al p-NPB.	119
Tabla 12. Tiempos de vida media (horas) de los diferentes derivados modificados de OC CALB	122

Tabla 13. Efecto de la naturaleza del soporte y la modificación química en fase sólida con etilendiamina y anhídrido succínico	126
Tabla 14. Enantioselectividad de las preparaciones inmovilizadas de CALB en la transesterificación del propanolol.	128
Tabla 15. Enantioselectividad de las preparaciones inmovilizadas de CALB en la transesterificación del (R/S)-atenolol.	131
Tabla 16. Titulación de los grupos amino libres tras la modificación secuencial con EDA y mPEG.	150
Tabla 17. Actividad enzimática de los derivados de OC-CALB modificados con EDA y PEG en la hidrólisis de p-NPB, 0.4 mM a pH 7.	152
Tabla 18. Actividad y enantioselectividad (E) de los diferentes derivados de CALB inmovilizados en Octil-agarosa y Eupergit C.	157
Tabla 19. Actividad y enantioselectividad de los derivados EC-CALB modificados con EDA y PEG, en la transesterificación de (R/S)-Atenolol.	159
Tabla 20. Actividad y enantioselectividad de los derivados EC-CALB modificados con EDA y PEG, en la transesterificación de (R/S)-Propanolol.	160
Tabla 21. Efecto de las condiciones experimentales (pH/concentración de glutaraldehído (% v/v)/ tiempo de reacción, h) sobre el grado de modificación de OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído.	178
Tabla 22. Actividad enzimática de los derivados de OC-CALB-C y OC-CALB-E modificados parcial y masivamente con glutaraldehído en la hidrólisis de p-NPB, 0.4 mM a pH 7	186
Tabla 23. Tiempos de vida media (horas) de los derivados OC-CALB-C-GLU y OC-CALB-E-GLU	189
Tabla 24. Tiempos de vida media (horas) de los derivados OC-CALB-C-GLU y OC-CALB-E-GLU en presencia de DMSO 50% v/v/ buffer tris-HCl 100 mM, pH 7.	193

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. mPEG	220
Anexo B. Curva de calibración	221
Anexo C. La actividad específica de la CAL B se determinó de la siguiente manera:	222
Anexo D. Curva calibración para la determinación de proteína mediante el método del BRADFORD	223

RESUMEN

TITULO: “OBTENCIÓN DE NUEVOS DERIVADOS DE LIPASA B DE *Candida antarctica* (CALB) POR TÉCNICAS DE MODIFICACIÓN QUÍMICO-ESTRUCTURAL EN FASE SÓLIDA”*

AUTOR: LUIS OVEIMAR BARBOSA JAIMES

**

Palabras claves: CALB, inmovilización, modificación química, modulación de propiedades biocatalíticas

Descripción: La Lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) es una de las enzimas más utilizadas en biocatálisis por su gran especificidad e incluso en ocasiones por su alta regio/enantio selectividad en diversos medios de reacción. Durante la catálisis, las lipasas sufren complejos cambios conformacionales con grandes variaciones alrededor de su centro activo, alterando su estructura entre una forma cerrada e inactiva y una forma abierta y activa. Esta flexibilidad del centro activo de las lipasas ha permitido cambiar dramáticamente su capacidad catalítica a través de diferentes estrategias como la inmovilización y la modificación química.

La modificación química de enzimas es una estrategia ampliamente usada en biocatálisis para el diseño de biocatalizadores con propiedades mejoradas. Esta, permite la introducción ilimitada de grupos funcionales modificando masivamente los residuos aminoacídicos externos de la enzima. Además, cuando la modificación química es realizada sobre enzimas inmovilizadas, las ventajas de la modificación aumentan con respecto a la modificación química de moléculas solubles por las facilidades de la fase sólida.

En consecuencia, en este trabajo de tesis doctoral, se modificó la superficie enzimática de CALB en fase sólida a través de la introducción de diferentes grupos catiónicos, aniónicos e hidrofóbicos y se estudió el efecto de estas modificaciones sobre la actividad, estabilidad y especificidad de la enzima. Los resultados obtenidos muestra que las modificaciones químicas realizadas sobre CALB permitieron el diseño de una librería de biocatalizadores con propiedades biocatalíticas mejoradas en comparación con la enzima no modificada. En consecuencia, la estrecha interrelación entre la inmovilización y la modificación química constituye una poderosa herramienta para la modulación de las propiedades biocatalíticas de las enzimas.

* Tesis Doctoral

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Doctorado en Química. Director: PhD. Rodrigo Torres. Codirector: PhD. Claudia Ortíz. Codirector: PhD. Roberto Fernández-Lafuente

ABSTRACT

TITLE: "NEW DERIVATIVES OF *Candida antarctica* Lipase B (CALB) MODIFICATION TECHNIQUES FOR STRUCTURAL CHEMICAL-SOLID PHASE"

AUTHOR: LUIS OVEIMAR BARBOSA JAIMES**

Keywords CALB, inmovilización, modificación química, modulación de propiedades biocatalíticas

Abstract: CALB is among the most used enzymes in biocatalysis, due to their broad specificity coupled in some instances to a high regio/enantio selectivity or specificity and high activity/stability in diverse reaction media. During catalysis, they suffer a quite complex conformational change, its structure altering from a closed form to an open form, with large variations around their active center. This flexibility of the active center of lipases has led to the dramatic change of their catalytic abilities by using different strategies, like immobilization or chemical modification.

Chemical modification of enzymes is a widely used tool in biochemistry and biocatalysis, to identify key groups in the catalysis of an enzyme or to improve enzyme performance. This research has been addressed to this last goal. Although chemical modification of proteins generally has not the site-directed potential of genetic manipulation, it has not a priori limit to the kind of groups to be introduced on the enzyme surface; it may be performed on enzymes with unknown structures and will be carried out in already fully folded proteins. These advantages are increased if the chemical modification of the enzyme is executed in an immobilized enzyme.

Accordingly, In this doctoral thesis, the surface was modified enzyme CALB solid phase through the introduction of various groups cationic, anionic and hydrophobic and studied the effect of these modifications on the activity, stability and specificity of the enzyme. The results show that the chemical modifications performed on CALB allowed designing a library biocatalytic biocatalysts with improved properties compared to the unmodified enzyme. Accordingly, the close relationship between the restraint and the chemical modification is a powerful tool for modulating biocatalytic properties of enzymes.

* Thesis doctoral

** Faculty of Sciences. School of Chemistry. PhD in Chemistry. Director: PhD. Rodrigo Torres. Codirector: PhD. Claudia Ortíz. Codirector: PhD. Roberto Fernández-Lafuente

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 LIPASAS

1.1.1 Generalidades. Las lipasas (triacil glicerol acil-hidrolasas EC 3.1.1.3) son un grupo de enzimas pertenecientes a la familia de las serina-hidrolasas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y catalizan la hidrólisis de triglicéridos para la formación de ácidos grasos y glicerol (**figura 1**) (Martinelle y col., 1995; Svendsen, A., 2000; Sharma y col., 2011).

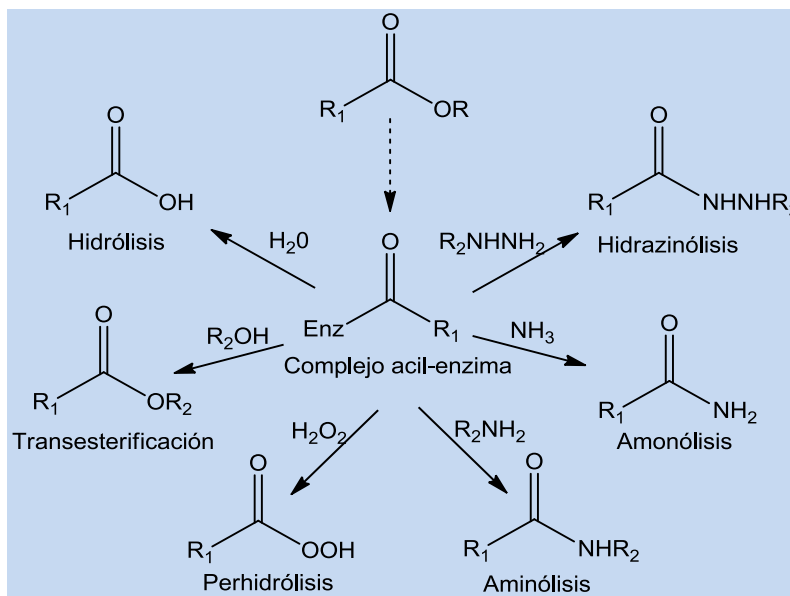
Figura 1. Función biológica de las lipasas. Hidrólisis de triglicéridos.



Las lipasas son consideradas las enzimas con mayor aplicación en síntesis orgánica debido a que exhiben alta especificidad e incluso regio y enantioselectividad, y porque catalizan una gran variedad de reacciones químicas que incluye 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 2**).

Figura 2. Reacciones catalizadas por lipasas.



1.1.2 Estructura de las lipasas. En los años 90, se determinó la estructura de diferentes lipasas mediante técnicas cristalográficas, identificándose en general una configuración de tipo α/β hidrolasa (Derewnda y col., 1992; Grochulsky y col., 1993; Ericsson y col., 2008). Además, se encontró que el centro activo de las lipasas está formado por una triada catalítica constituida por serina (Ser), histidina (His) y otro aminoácido que suele ser ácido aspártico (Asp) o ácido glutámico (Glu), que se encuentran en una cavidad conocida como hueco hidrofóbico de la enzima.

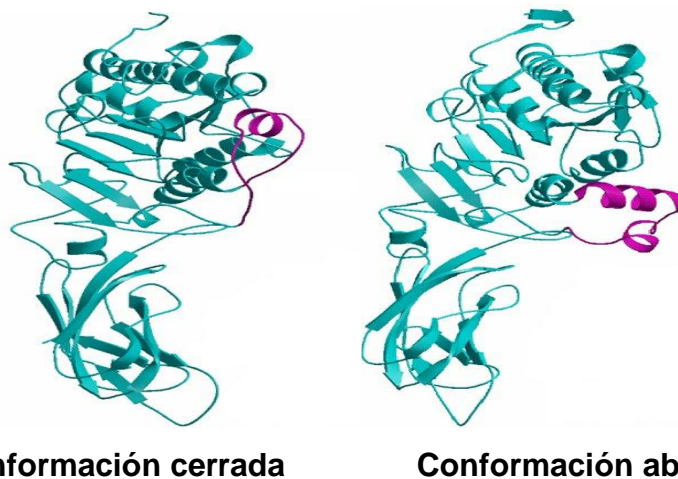
De igual forma, se determinó que en la mayoría de las lipasas existe un elemento móvil, el cual es conocido como "lid" o tapadera, conformado por una o dos estructuras alfa-hélice cortas, unidas al cuerpo de la lipasa mediante elementos flexibles. Brzozowski y col., (1991) y Uppenberg y col., (1994), confirmaron y

demonstraron la existencia del *lid* sobre el sitio activo de las lipasas a través del estudio de la formación de complejos enzima-inhibidor.

La información acerca de la conformación estructural de las lipasas permitió establecer que en presencia de medios acuosos homogéneos, la lipasa cristaliza con el centro activo totalmente aislado del medio de reacción por la tapadera (flat o *lid*), haciendo inaccesible la entrada de los sustratos (conformación cerrada) hacia el sitio activo. Esta cadena polipeptídica presenta en su cara interna una serie de residuos hidrofóbicos que interaccionan con las zonas hidrofóbicas que rodean al sitio activo de las lipasas (Bastida y col., 1998; Palomo y col., 2002).

Por el contrario, cuando la enzima se cristaliza en presencia de interfases hidrofóbicas se obtiene una conformación totalmente distinta, en la cual la tapadera se desplaza del centro activo producto de la interacción entre puentes salinos y puentes de hidrógeno con otra zona de la superficie de la lipasa, dejando libre el centro activo de la enzima (conformación abierta) (Bastida y col., 1998; Reis y col. 2008; Reis y col., 2008; Reis y col., 2009; Rehm y col., 2011). La **figura 3** muestra las distintas conformaciones de las lipasas.

Figura 3. Conformaciones estructurales de la lipasa B de *Candida antarctica*.



Tomada de Protein Data Bank, código de acceso 1TCB.

Las singulares características estructurales de las lipasas sugieren que la presencia del *lid* es un determinante estructural y funcional de la actividad y selectividad de esta enzima en la catálisis de diferentes reacciones de biotransformación en química orgánica (Overbeeke y col., 2000; Reetz, 2002; Barros y col., 2010; Casas-Godoy y col., 2012).

En 2006 Francesco Secundo y colaboradores, investigaron sobre la influencia del “lid” sobre las propiedades biocatalíticas de las lipasas. En el estudio, se modificaron por mutagénesis algunos aminoácidos de la secuencia del lid de tres lipasas recombinantes: *Candida rugosa* (CRL), *Pseudomonas fragi* (PFL) y *Bacillus subtilis* (BSLA). Las lipasas modificadas presentaron menor actividad y selectividad en reacciones de esterificación en solventes orgánicos. Los resultados obtenidos soportan fuertemente la idea de la importancia que tiene el *lid* en la modulación, no sólo de la actividad, sino también en la especificidad, enantio-selectividad y estabilidad de las lipasas.

Recientemente, Wei y col., 2012, investigaron el efecto de la flexibilidad conformacional del *lid* sobre la actividad catalítica y estabilidad térmica de la lipasa *Rhizopus chinensis*. En este caso, se indujo la formación de un enlace de puente disulfuro en la región del lid, con el fin de limitar su movilidad. Los resultados obtenidos mostraron que la enzima mutante es 12 veces más termo-estable que la enzima no mutada. A su vez, esta modificación estructural no afectó el rendimiento catalítico de la lipasa.

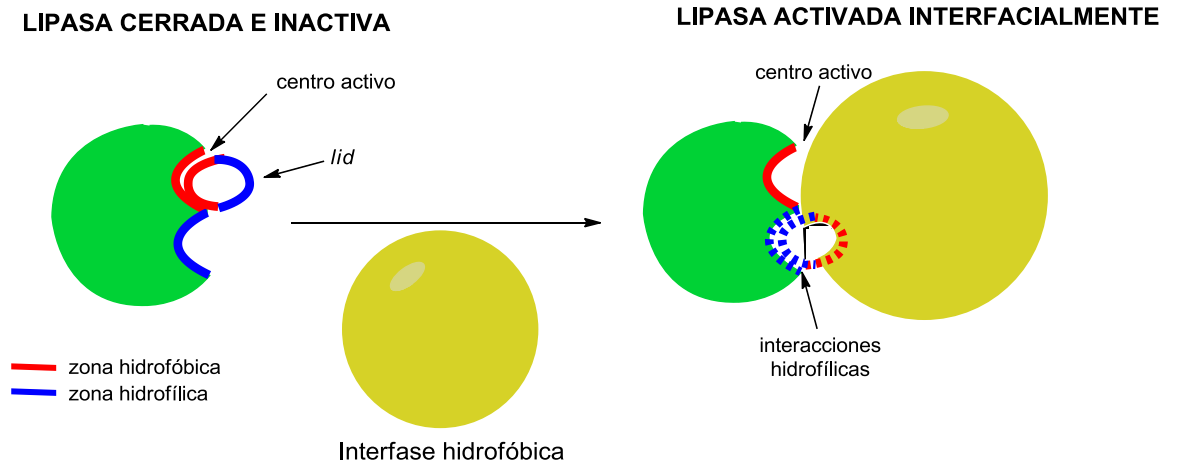
De acuerdo con lo anterior, a la hora de utilizar las lipasas en reacciones de química orgánica, es preciso considerar algunas peculiaridades de su mecanismo de activación interfacial, para lo cual resulta indispensable el estudio de la estructura molecular.

1.1.3 Mecanismo de acción de lipasas. La información de las conformaciones estructurales de las lipasas permitió establecer que en su mecanismo catalítico ocurre un fenómeno denominado “activación interfacial de lipasas” (Desnuelle, 1972). Este término es usado para describir el incremento en la actividad catalítica de este tipo de enzimas cuando interactúan con interfases hidrofóbicas (Vergel, 1997; Reis, 2009; Palomo, 2012).

La principal característica de las lipasas es la actividad en presencia de interfases hidrofóbicas (micelas de sustratos, solventes orgánicos no miscibles, etc.), descrita inicialmente por Sarda y Desnuelle (1958). Posteriormente, se confirmaron los resultados previamente publicados con otros estudios cristalográficos (Brady y col., 1990; Brozowski y col., 1991; Nobel y col., 1993; Ericsson y col., 2008).

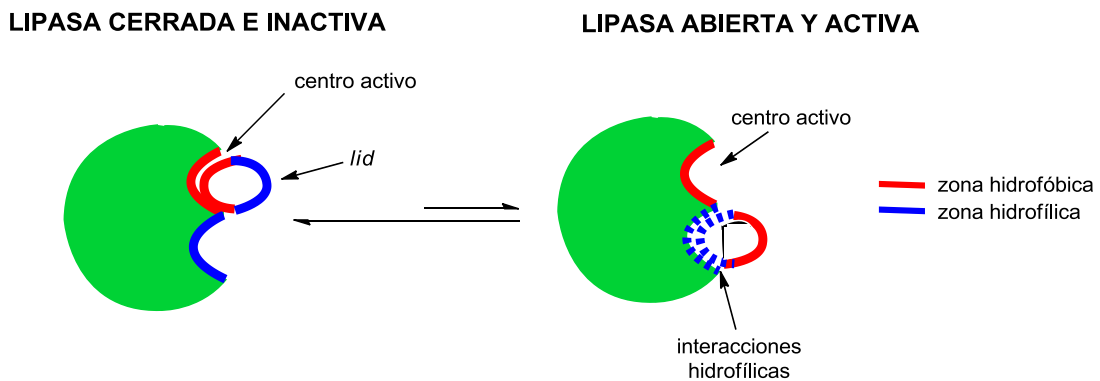
De acuerdo con el mecanismo de activación interfacial, las lipasas muestran una cadena polipeptídica (lid) en su estructura secundaria, la cual cubre el sitio activo, impidiendo el acceso del sustrato (conformación cerrada) cuando se encuentran en ausencia de interfases. Sin embargo, en presencia de interfases hidrofóbicas, se presentan importantes cambios que dan lugar a la generación de una “conformación abierta” de la enzima en la cual el lid es desplazado como resultado de la exposición de superficies hidrofóbicas que ahora interactúan con la interfase. De esta manera, confieren funcionalidad a la enzima (Palomo y Guisan, 2012). La **figura 4**, representa de forma esquemática el mecanismo de activación interfacial que muestran las lipasas.

Figura 4. Activación interfacial de lipasas con interfases hidrofóbicas.



Por otro lado, es evidente que las lipasas en medios acuosos presentan actividad catalítica, en muchos casos comparables a la de esterasas no lipásicas. Esto sugiere que las lipasas en sistemas acuosos homogéneos se encontrarían en un cierto equilibrio entre la conformación cerrada y la conformación abierta que les permiten ser catalíticamente activas en medios acuosos homogéneos, tal como se representa en la **figura 5**.

Figura 5. Equilibrio conformacional de lipasas en medios acuosos homogéneos

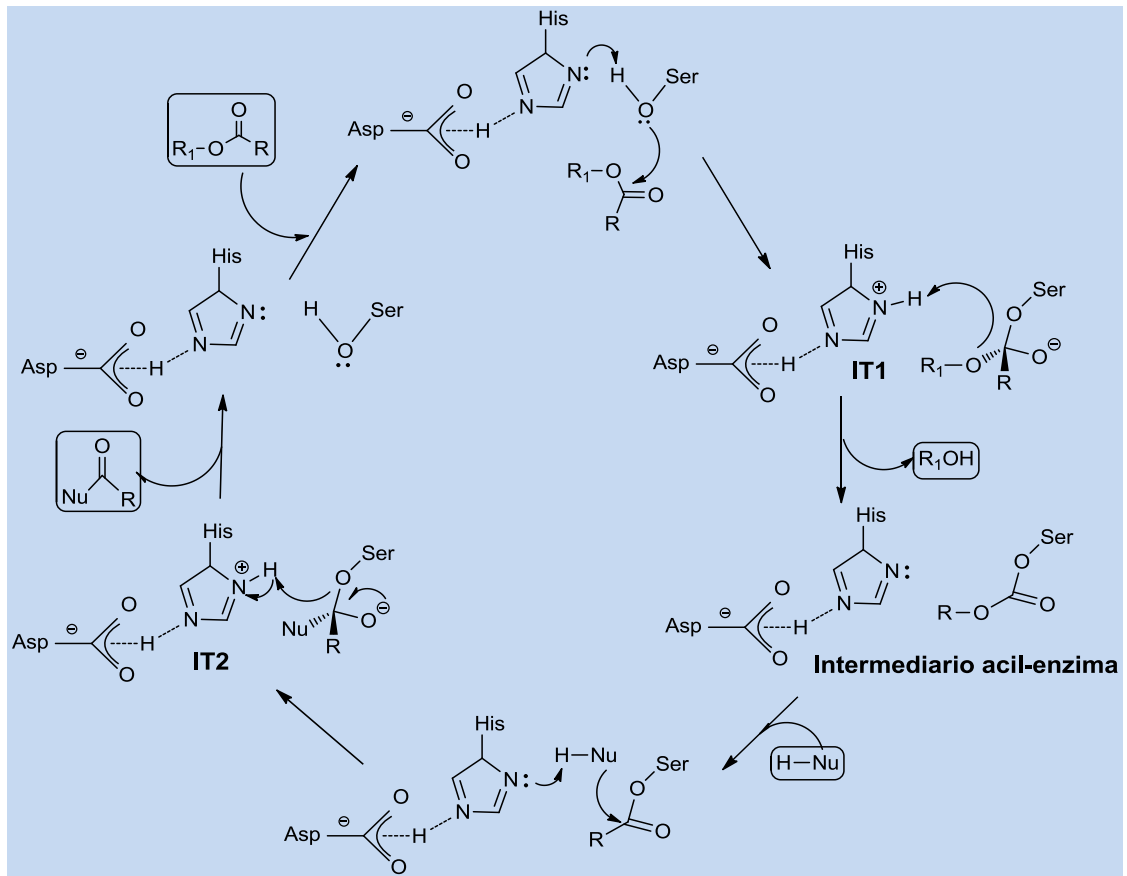


1.1.4. Mecanismo catalítico de las lipasas en solventes orgánicos. Las lipasas presentan un mecanismo de reacción en medios orgánicos similar al que presentan las serina-proteasas. De acuerdo con este mecanismo, una vez que el sustrato se sitúa en el sitio activo de la lipasa, se forma inicialmente el complejo enzima-sustrato (complejo de Michaelis). La formación del complejo es mediada por la triada catalítica así:

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 6**) (Lutz, 2004; Kwong y col., 2007).

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. La **figura 6** muestra el mecanismo catalítico de las lipasas.

Figura 6. Mecanismo catalítico de lipasas.

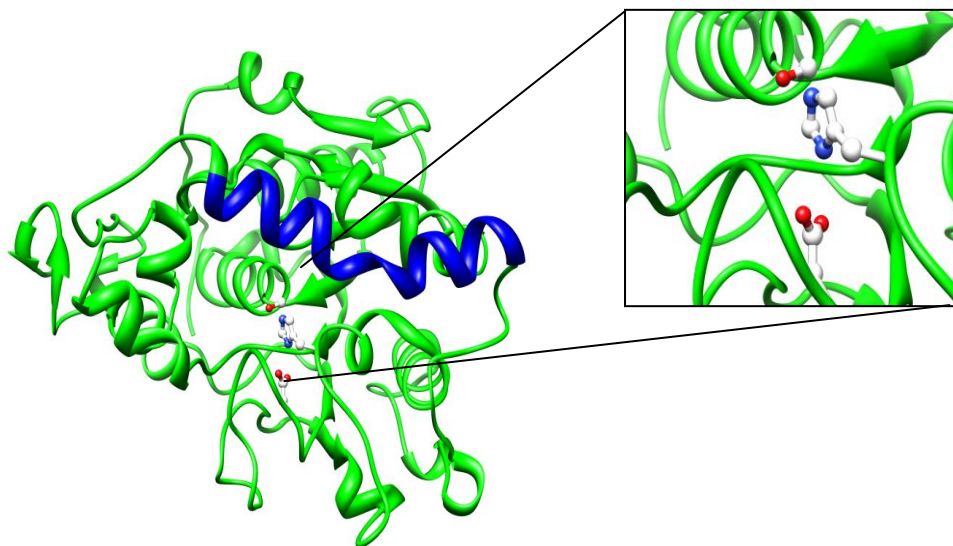


1.1.5 Lipasa B de *Candida antarctica* (CALB). La CALB es una isoenzima que proviene de la levadura *Candida antarctica*. Fue aislada por primera vez en la Antártida cuando se examinaban enzimas activas en condiciones extremas. Actualmente, es obtenida a partir de procesos de clonación y sobreexpresión en el hongo *Aspergillus oryzae* (Kirk y col., 2002).

La lipasa B de *Candida antarctica* presenta un peso molecular de 33 kDa y un punto isoelectrónico 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 (**Figura 7**). Su sitio activo consiste de una triada catalítica de serina, histidina y aspartato. La entrada a dicho sitio activo se encuentra

restringida por una α -hélice hidrofóbica (*lid*) muy importante en la especificidad y estereoespecificidad de la enzima frente a diferentes sustratos (Uppenberg col., 1994).

Figura 7. Estructura Lipasa B de *Candida antarctica*.



Tomada de protein Data Bank (1LBT.pdb). Software de visualización Chymera.

La CALB es ampliamente usada como biocatalizador debido a la aceptable regioselectividad y enantioselectividad frente a alcoholes, aminas, ésteres y ácidos racémicos (Anderson y col., 1998; Kirk y col., 2002; Juhl y col., 2010; Escorcía y col., 2011; Kolodziejaska y col., 2012). La CALB en forma inmovilizada exhibe una gran estabilidad frente a un amplio rango de valores de pH y temperatura. De esta forma, se han implementado en diferentes reacciones orgánicas, incluyendo muchas que han sido implementadas a escala comercial (Kirk y col., 2002).

1.1.6 Modulación de las propiedades catalíticas de las lipasas. La posibilidad de disponer de derivados enzimáticos altamente estables en condiciones de operación de la industria, es uno de los objetivos más importantes en reacciones de biotransformación. Para el caso particular de las lipasas, en las cuales se presenta un equilibrio conformacional, es interesante conocer cuál de las dos

configuraciones es más estable. Es decir, la estructura abierta o la cerrada. De acuerdo con lo anterior, resulta interesante la preparación de diferentes derivados de lipasas en los cuales a través de estrategias de inmovilización sea posible la modulación de las propiedades catalíticas por la alteración del equilibrio conformacional existente (Bastida y col., 1998; Mateo y col., 2000, Mateo y col., 2007; Barbosa et al., 2010).

El equilibrio conformacional de las lipasas sugiere que la permanencia de una estructura abierta o cerrada, se da a través de un gran número de fuerzas intra- e inter-moleculares. Por lo tanto, es posible que una variación en la densidad de carga de la enzima, altere la forma exacta del centro activo y en consecuencia las propiedades biocatalíticas de la lipasa. Para tal fin, es posible utilizar herramientas de ingeniería de proteínas tales como la modificación química de residuos aminoacídicos superficiales de la enzima, la ingeniería del medio de reacción y la ingeniería del derivado (Palomo y col., 2004; Palomo, 2008; Marciello y col., 2012).

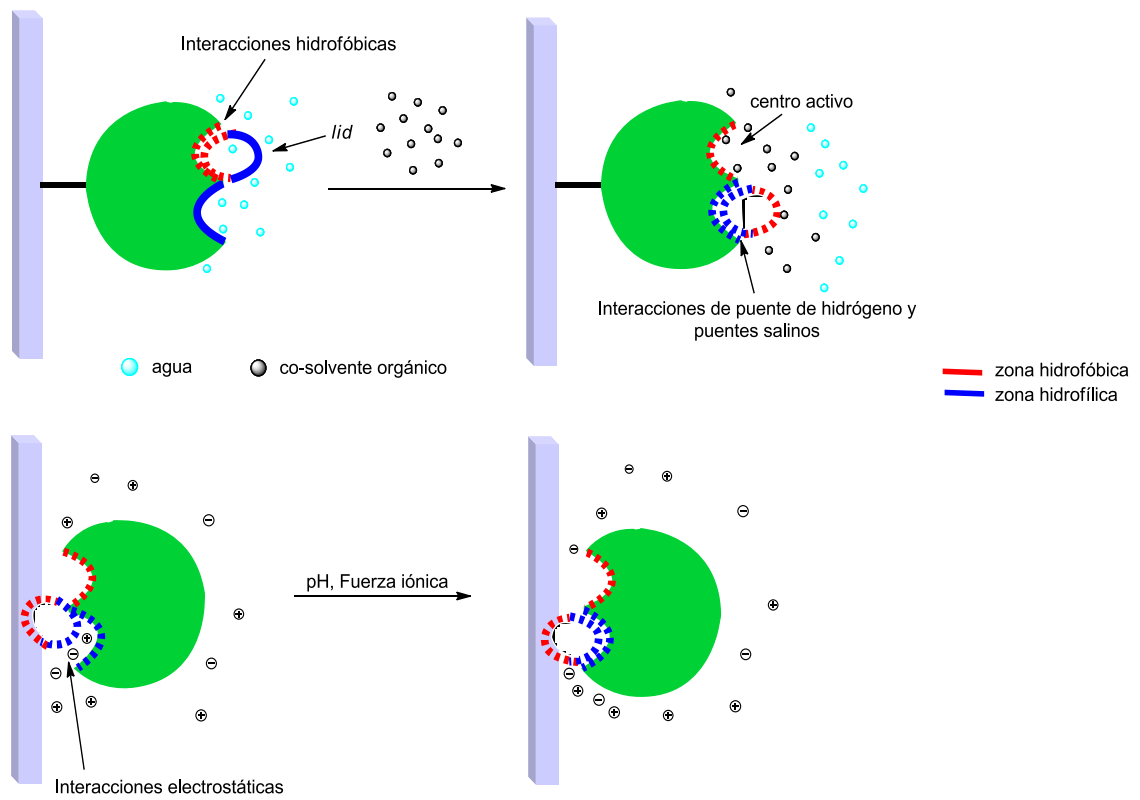
1.1.6.1 Ingeniería del medio de reacción. Se ha descrito en la literatura que las propiedades catalíticas de las lipasas (actividad, enantioselectividad y estabilidad), pueden ser moduladas por las condiciones del medio de reacción (Persichetti y col., 1996; Wehtje y col., 1997; Watanabe y col., 2009; Pan y col., 2010; Barbosa y col., 2011; Marciello y col., 2012). Esto puede ser consecuencia del complejo mecanismo de acción (activación interfacial) de las lipasas que involucra cambios conformacionales significativos en la estructura de la enzima (Brzozowski y col., 1991; Derewenda y col., 1992).

De esta manera, cualquier cambio en las condiciones del medio puede alterar significativamente todo el balance de interacciones moleculares. Por ejemplo: los disolventes favoreciendo el bolsillo hidrofóbico y fortaleciendo las interacciones electrostáticas, el pH alterando el tipo y cantidad de interacciones entre el *lid* y el resto de la superficie de la proteína, la fuerza iónica haciendo más desfavorable la

presencia del bolsillo hidrofóbico y debilitando las interacciones del *lid* con el resto de la proteína, etc. Por lo tanto, las condiciones experimentales afectarán dramáticamente el equilibrio entre la conformación abierta y cerrada de la lipasa, la forma exacta del centro activo, y sus propiedades catalíticas. Además, la orientación del “*lid*” estará promovida por un cierto número de interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno entre otras (Palomo y col., 2002; Palomo y col., 2004; Palomo, 2008; Barbosa y col., 2011).

La **figura 8**, representa la complejidad de los cambios conformacionales que experimentan las lipasas. En relación con la forma abierta, la estructura de las lipasas estará definida por la interacción del bolsillo hidrofóbico, con el sustrato o con el medio de reacción.

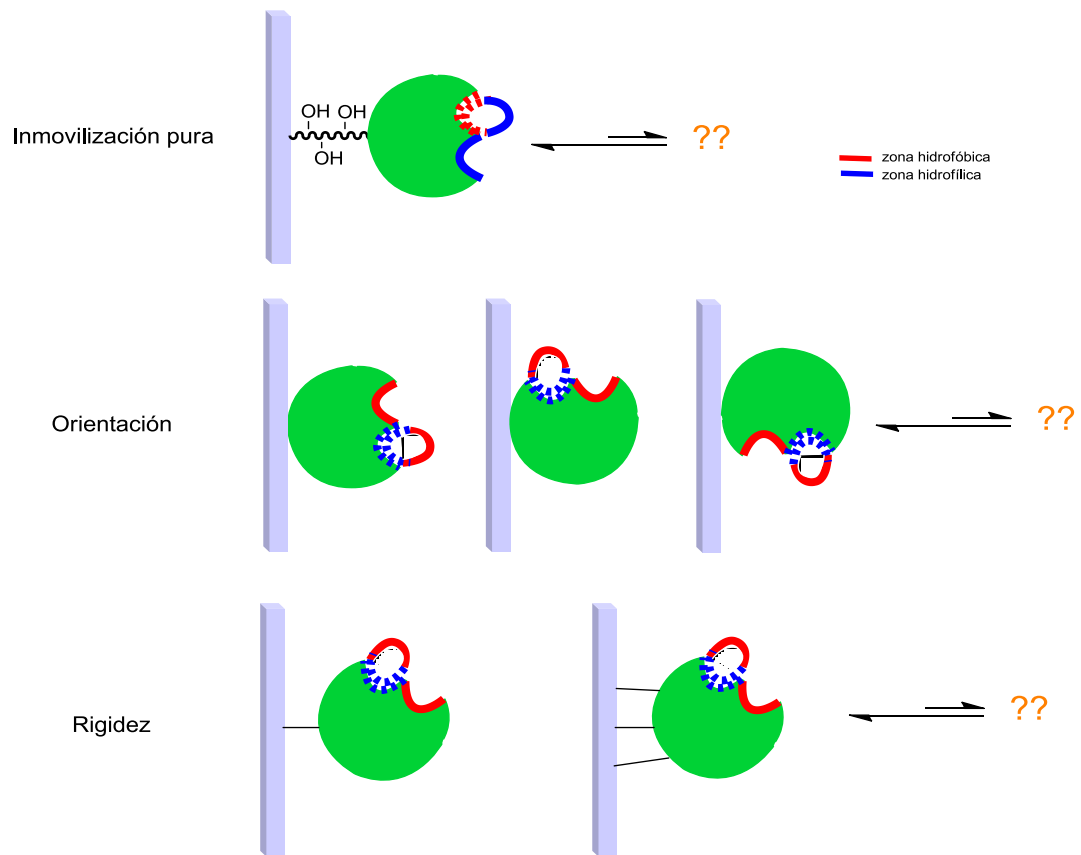
Figura 8. Efecto de las condiciones experimentales en el mecanismo de apertura y cierre de la lipasa.



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).

1.1.6.2 Ingeniería del derivado. El desarrollo de diferentes estrategias de inmovilización sobre una gran variedad de soportes activados con diferentes grupos funcionales, ha permitido el avance de metodologías que permiten inmovilizar proteínas de forma controlada y dirigida a través de diferentes zonas de la superficie (aquellas con mayor densidad de histidinas, lisinas, etc.). El grado de activación del soporte y las condiciones de inmovilización permiten controlar el grado de unión enzima-soporte y por lo tanto la rigidez de la zona inmovilizada (**Figura 6**) (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 9. Modulación de las propiedades catalítica a través de la Ingeniería del derivado.



Diferentes investigaciones han demostrado la efectividad de la ingeniería del derivado para la modulación de las propiedades catalíticas de las enzimas, especialmente de las lipasas (Rodrigues y Col., 2012; Marciello y col., 2012).

En el año 2000, Mateo y colaboradores inmovilizaron diferentes enzimas sobre soportes epóxidos multifuncionales, proponiendo este tipo de inmovilización como una herramienta útil para mejorar la inmovilización covalente de proteínas.

Posteriormente, Palomo y col (2002), modificaron las propiedades de actividad y enantioselectividad de la lipasa de *Candida antarctica B* (CAL-B) mediante herramientas de ingeniería conformacional. Esta lipasa fue inmovilizada en

soportes poliméricos activados con diferentes grupos funcionales para interactuar con los aminoácidos superficiales de las lipasas. Cada derivado inmovilizado presentó diferente actividad y enantioselectividad al catalizar la hidrólisis de un compuesto aquiral y dos compuestos quirales bajo diferentes condiciones de reacción. Así por ejemplo, se obtuvo el enantiómero R del ácido mandélico con una pureza del 91% utilizando CAL-B inmovilizada en soportes activados con polietilenimina (PEI), mientras que el enantiómero R del ácido 2-butirol-2-fenilacético fue obtenido con una pureza del 99.5% utilizando el derivado enzimático de lipasa inmovilizada en soportes activados con glutaraldehído.

Ese mismo año (2002), Palomo y col., realizaron la purificación e inmovilización de la CAL-B mediante los siguientes protocolos: adsorción interfacial sobre soportes de glioxil-agarosa, adsorción iónica en soportes rodeados con polietilenimina (PEI) e inmovilización covalente en soportes activados con glutaraldehído. En este caso, el derivado obtenido por adsorción interfacial presentó la mayor actividad hidrolizando 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.

Adicionalmente, Palomo y col. (2003), modificaron las propiedades catalíticas de la lipasa de *Mucor miehei* mediante inmovilización directa en resinas epóxido heterofuncionales. En este estudio, se produjo el enantiómero S del ácido 2-fenil-2-butirol-acético con una pureza del 90% y una enantioselectividad de 59, utilizando el derivado sobre un soporte activado con grupos carboxilos provenientes del ácido iminodiacético (IDA-Sepabeads).

En el año 2005, Fernández-Lorente y col., purificaron diferentes lipasas de *Aspergillus niger* utilizando adsorción interfacial selectiva de lipasas sobre soportes hidrofóbicos. Con estos derivados se obtuvo el enantiómero S del ácido 2-fenil-2-

butiroilacético con una pureza mayor del 99% y una enantioselectividad mayor de 100.

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

Kramen y col. (2010), inmovilizaron la CAL-B sobre un soporte de silica fundida. Estos derivados catalizaron la síntesis de (R)-fenil-etanol con una elevada enantioselectividad.

Miletić y col. (2010), incrementaron la actividad de la lipasa B de *Candida antarctica* (CAL-B) en la hidrólisis de p-nitrofenil acetato, a través de su inmovilización sobre un soporte novedoso basado en una matriz polimérica macroporosa de poli(glicidil-metacrilato-co-etilenglicol dimetacrilato). Los resultados mostraron que la estrategia de inmovilización permitió incrementar la actividad de la enzima en un factor de 10 con respecto a la actividad de CALB soluble.

Hernández y Fernandez-Lafuente (2011) inmovilizaron la lipasa B de *Candida antarctica* sobre un soporte hidrofóbico de octil-agarosa y evaluaron la estabilidad de esta preparación al incubarse en concentraciones elevadas de peróxido de hidrógeno. Los resultados obtenidos mostraron que el derivado de CalB retuvo hasta un 55% de su actividad inicial después de 4 días de incubación en peróxido (10 mM), lo que contrasta con tan solo el 15% de actividad retenida en 24 horas de incubación de la enzima soluble.

Recientemente, se han implementado distintos protocolos para la inmovilización de diferentes lipasas que incluyen el uso de soportes poco convencionales (Feng y col. 2013; Li y col., 2013; Yu y col., 2013). Por ejemplo, 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.

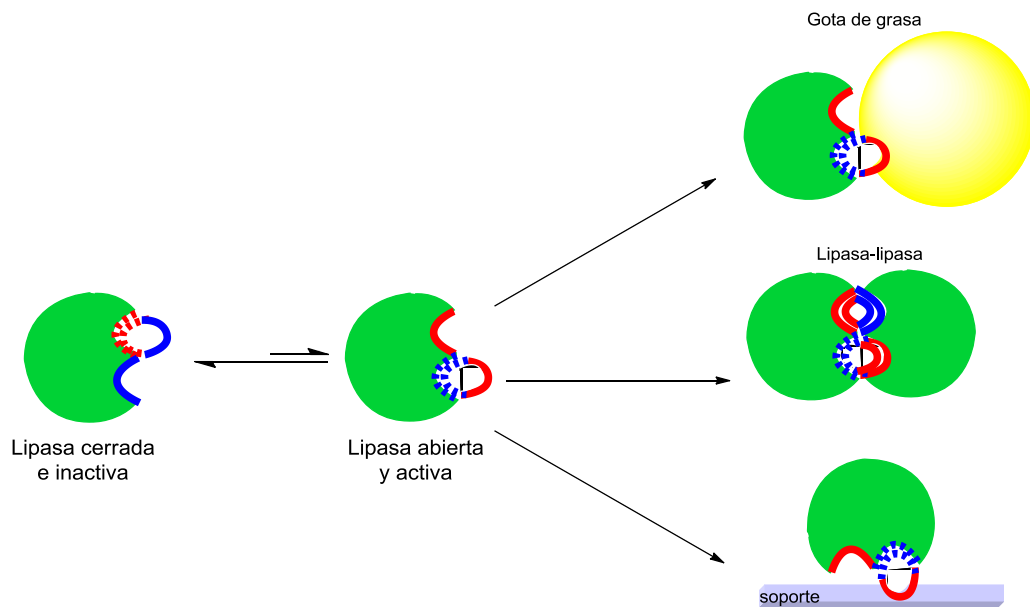
1.1.7 Obtención de biocatalizadores lipásicos con distinta orientación utilizando diferentes estrategias de inmovilización. La inmovilización de enzimas, se presenta a través de interacciones químicas (iónicas, hidrofóbicas o covalentes) entre los residuos aminoacídicos de la molécula proteica y el soporte. Para el caso particular de las lipasas, se ha desarrollado un número importante de protocolos de inmovilización que incluyen estrategias de tipo reversible e irreversible (Cabrera et al., 2009; Cowan y Fernández-Lafuente, 2011; Marciello y col., 2012; Yu y col., 2013; Feng y col., 2013). Tales estrategias tienen como fin, evitar pérdidas considerables en la actividad y enantioselectividad del biocatalizador, al comprometer el sitio activo (o residuos cercanos) de la enzima en la unión con el soporte.

El tipo de soporte y la activación de la superficie del mismo son parámetros altamente significativos en la orientación que adquiere la lipasa y la forma en que expone su sitio activo. No obstante, diferentes publicaciones científicas han demostrado la modificación de las propiedades biocatalíticas de una misma lipasa por efecto de su inmovilización en soportes de diferente naturaleza química (Palomo y col., 2003; Palomo y col., 2004; Palomo y col., 2005).

1.1.7.1 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 (**figura 10**). De

esta manera, se han desarrollado métodos eficientes de inmovilización reversible y específicos para estas enzimas (Malcata y col., 1992; Bosley y Clayton, 1994; 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, glioxil) a través de adsorción interfacial (Fernández y col., 1998; Sabuquillo y col., 1998; Cuhna y col., 2008; Fernández-Lorente y col., 2008).

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.

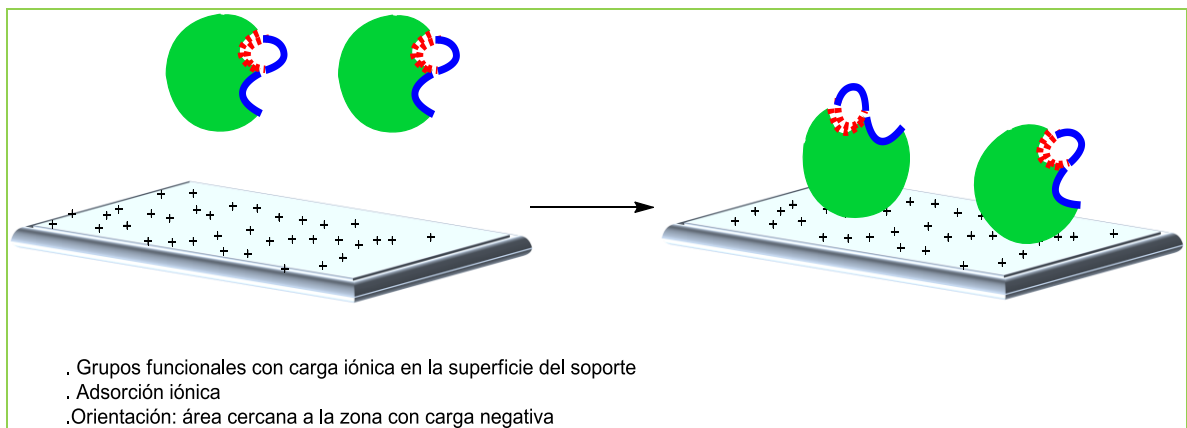
Por ejemplo, Sabuquillo y col., (1998) purificaron a través de cromatografía de afinidad interfacial preparados comerciales de lipasas de *Rhizopus niveus* (RNL) y *Candida rugosa* (CRL) sobre soportes hidrofóbicos activados con butil, fenil y octil-agarosa, a baja fuerza iónica. Los resultados obtenidos 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.

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.

1.1.7.2. Inmovilización de lipasas por intercambio iónico. La adsorción de proteínas por intercambio iónico es uno de los procedimientos de inmovilización más sencillos. De hecho, este procedimiento se aplicó para el desarrollo del primer proceso industrial que utilizaba enzimas inmovilizadas (Chibata y Tosa, 1976; Katchaski-Katzir, 1993). En este caso, la proteína no se fija al soporte a menos que se produzca una adsorción multipuntual. Por lo tanto, se asume que las proteínas se inmovilizarán fundamentalmente a través de las zonas con mayor densidad de grupos con carga positiva o negativa, es decir, donde las posibilidades de una interacción multipuntual serían mayores (**Figura 11**).

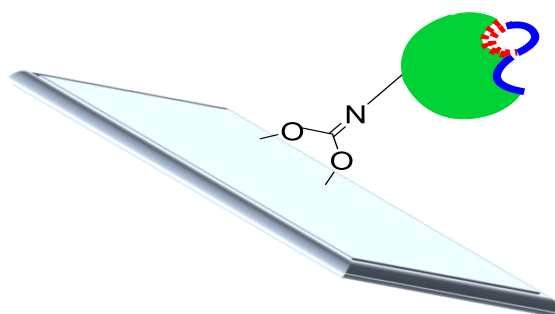
Figura 11. Adsorción iónica de lipasas sobre soportes iónicos mono-amino-etil-N-amino-etil agarosa (MANAE) y Dietil-amino-etil agarosa (DEAE).



1.1.7.3. Inmovilización covalente de lipasas sobre el soporte Bromuro de Cianógeno Agarosa (BrCN). La inmovilización de enzimas sobre soportes agarosa activados con grupos bromuro de cianógeno es uno de los protocolos de inmovilización covalente más utilizados (Fernández y col, 2007; Volpato y Col., 2009; Godoy y Col., 2011).

La inmovilización de la enzima sobre BrCN-agarosa procede a través de la reacción que se da entre el grupo amino más reactivo de la proteína a pH 7 (posiblemente el grupo amino-terminal) y el grupo ciano del soporte (figura 14). Por esta razón, se considera que la enzima es inmovilizada a través de un enlace covalente unipuntual.

Figura 12. Inmovilización de lipasas sobre BrCN-agarosa.



- Inmovilización a través del grupo amino-terminal.
- Unión covalente en un solo punto.

1.1.8. Modificación química de proteínas. El uso de las enzimas como biocatalizadores en la resolución de mezclas racémicas de moléculas orgánicas, principalmente fármacos, ha implicado el desarrollo de estrategias que permitan modificar las propiedades catalíticas naturales de las enzimas. En este contexto, la modificación por mutagénesis dirigida y la modificación química han sido consideradas herramientas eficaces para este fin (Fagain, 1995; Davis, 2003; O'fágáin, 2003; Iyer y Ananthanarayan, 2008; Baslé y col., 2010; Fernández-Lorente y col., 2011).

La modificación química presenta ventajas en comparación con las técnicas de mutagénesis dirigida. 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 (Lundblad, 1991). 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). 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). Por ejemplo:

- i) 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.
- ii) 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.

- iii) 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 (Fernández-Lafuente y col., 1992; Rodríguez y col., 2011).

Por lo anteriormente descrito, en esta tesis doctoral se ha propuesto una estrategia para la modulación de las propiedades catalíticas de la lipasa B de *Candida antarctica*, que combina su inmovilización sobre el soporte de Octil-agarosa, y su posterior modificación química a través de diferentes técnicas, entre las cuales se destacan (**Figura 13**):

- a) La aminación de grupos carboxilo de enzimas con etilendiamina a pH neutro permite cambiar grupos con carga negativa por grupos cargados positivamente. El cambio en la carga neta de la proteína puede generar nuevas fuerzas de repulsión donde anteriormente había interacciones iónicas (Rodríguez y col., 2011). En ciertos casos, este tipo de modificación puede producir una mejora en las propiedades funcionales de las enzimas. Por ejemplo, la modificación química de grupos carboxilo de glucoamilasa de *Fusarium solani* con etilendiamina como nucleófilo en presencia de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida permitió un incremento en la actividad catalítica y en la estabilidad térmica de la glucoamilasa (Bhatti y col., 2007; Rodríguez y col., 2011).
- b) La modificación química con polímeros poli-funcionales permite alterar moderadamente la superficie de las proteínas y ofrece algunas ventajas. En primer lugar, los polímeros de gran tamaño (aunque sean de mayor tamaño que la enzima) pueden recubrir un gran porcentaje de la superficie de la proteína alterando con ello la naturaleza química de la misma. En segundo

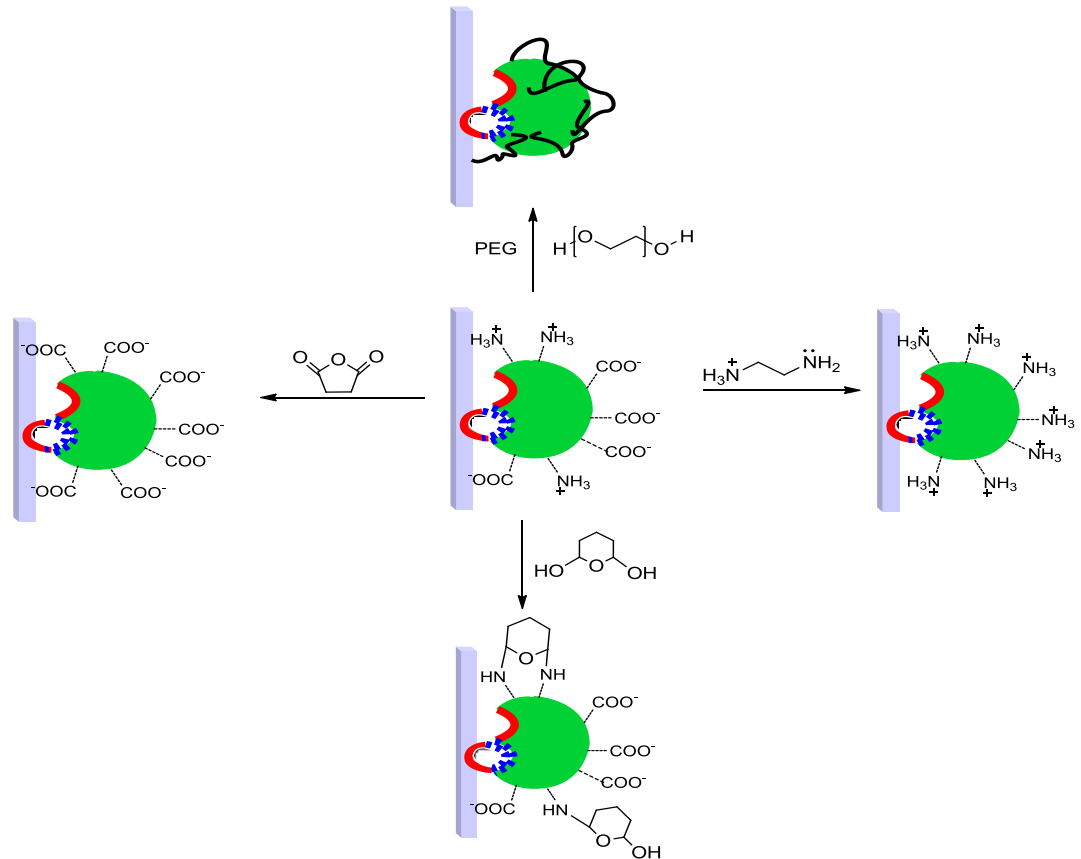
lugar, pueden contener diferentes grupos reactivos inclusive de naturaleza química diferente. La combinación de estas características hace que los polímeros poli-funcionales, sean agentes modificantes muy adecuados para estabilizar las proteínas a través de entrecruzamientos intramoleculares. Además, el revestimiento completo de la superficie de la molécula proteica por el gran tamaño del polímero, probablemente evitaría la formación de enlaces intermoleculares al envolver todas las subunidades de la enzima. En este sentido, se ha descrito al dextran-aldehído como un polímero polifuncional con un alto potencial para este fin (Fuentes y col., 2004; Rodriguez y col., 2011).

- c) La modificación covalente con polímeros homofuncionales anfifílicos como el polietilenglicol (PEG) ha sido una técnica empleada para estabilizar proteínas e incrementar su solubilidad para su aplicación en solventes orgánicos. Ejemplo de ello es el incremento en la estabilidad de la lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en isooctano después de la modificación con PEG (Hernaiz y col., 1997). Para la modificación de una proteína con PEG, es necesario activar el polietilenglicol, a través de la preparación de un conjugado pegilado. Dicho conjugado posteriormente puede reaccionar con aminoácidos reactivos de la proteína tales como lisinas, cisteínas, histidinas, argininas, ácido aspártico, ácido glutámico, serinas, grupos amino N-terminal y grupos carboxilo C-terminal (Roberts y col., 2002).

- d) El entrecruzamiento químico de grupos funcionales de la superficie proteica a través del uso de reactivos bifuncionales (glutaraldehído y formaldehído) constituye una poderosa herramienta de modificación química. La metodología consiste básicamente en la formación de enlaces covalentes entre los grupos reactivos del agente bifuncional y los residuos aminoacídicos de la enzima, principalmente lisina. Los enlaces covalentes formados pueden generar entrecruzamientos intramoleculares e intermoleculares que rigidifican la estructura terciaria de la enzima, restringiendo de esta manera los cambios

conformationales inducidos por agentes externos como el calentamiento o solventes orgánicos (DeSantis y Jones, 1999; Roberts y col., 2002; Migneault y Dartiguenave, 2004).

Figura 13. Estrategias de modificación química de enzimas en fase sólida.



1.1.9 Resolución cinética catalizada por lipasas. La resolución cinética de compuestos racémicos es probablemente la biotransformación por excelencia de las lipasas en procesos de síntesis orgánica. Al igual que las esterasas, las lipasas son proteasas serínicas empleadas en la síntesis de drogas quirales y agroquímicos, donde su centro activo cataliza la hidrólisis o la síntesis de ésteres mediante mecanismos de acilación – deacilación (Bianchi, 1989; Gotor-Fernández y col., 2006; Wang y Tsai, 2009). El éxito de la reacción biocatalítica depende de

que los dos enantiómeros puedan reaccionar a distintas velocidades con una molécula quiral (Rouhi, 2003, Van-Beilen y Li, 2003).

La reacción de resolución cinética catalizada por lipasas para un sistema reversible se puede representar como se muestra en la **figura 14**. En el estado inicial de la reacción la enzima reacciona preferiblemente sobre el enantiómero A (reactante más rápido) y lo transforma en su respectivo producto P, mientras la concentración del enantiómero B (reactante lento) se mantiene mayoritariamente intacta. Cuando se establece el equilibrio entre el enantiómero A y el producto P la concentración del enantiómero B comienza a cambiar, disminuyendo la pureza óptica del enantiómero A remanente y del producto P. Por lo que el tiempo óptimo para terminar la resolución es cuando se haya alcanzado el equilibrio del reactante rápido (Chen y col., 1982).

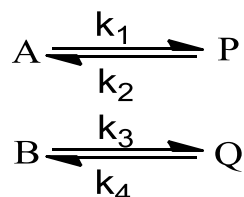
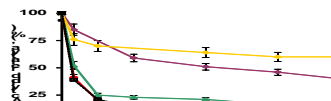


Figura 14. Resolución cinética catalizada por lipasa para un sistema reversible. La resolución ocurre cuando k_1 es diferente de k_3 , de tal forma que entre mayor sea la diferencia se obtendrá una mejor resolución. Para un sistema irreversible $k_2 = k_4 = 0$.

Puesto que las lipasas poseen la habilidad de discriminar entre dos enantiómeros a partir de una mezcla racémica, el parámetro escogido para describir la estereoselectividad o enantio-selectividad de las reacciones catalizadas por lipasas es la relación enantiomérica (E). E es un parámetro cinético, que depende del catalizador y de las condiciones del medio (pH, temperatura, etc.). El valor de E

está definido como la relación de las constantes específicas de velocidad para los dos enantiómeros de la mezcla racémica, de acuerdo con la siguiente ecuación:



R es el enantiómero reactante más rápido (2)

Donde k es la constante de velocidad y K_m es la constante de Michaelis-Menten. Rakels et al, (1993) desarrollaron esta ecuación en términos del exceso enantiomérico del producto (ee_p), el enantiómero remanente (ee_s) y la conversión (c). De tal forma que para una reacción enzimática reversible, el valor de E puede ser expresado por la siguiente ecuación:

$$E = \frac{\ln \left[\frac{-K + c}{-K + c + ee_p} \right]}{\ln \left[\frac{-K + c}{-K + c - ee_p} \right]} = \frac{\ln \left[\frac{-K + c + ee_s}{-K + c} \right]}{\ln \left[\frac{-K + c - ee_s}{-K + c} \right]} \quad (3)$$

Donde K es la constante de equilibrio. K es una función termodinámica que es independiente de las propiedades de la enzima, sólo depende del estado inicial y final por lo que no depende de la trayectoria de reacción. Sih y col., 1993 encontraron también que la pureza óptica de los compuestos (producto y sustrato remanente) varía de manera inversa con la constante de equilibrio, aun para sistemas con alta enantioselectividad ($E > 1000$).

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

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

Donde c está expresada por la siguiente ecuación:

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

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

El objetivo principal de esta tesis doctoral fue modular las propiedades biocatalíticas de la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB), a través de estrategias de modificación químico estructural en fase sólida disponibles en ingeniería de proteínas, para obtener nuevos derivados de CALB con propiedades biocatalíticas mejoradas.

Para el logro de este objetivo, se partió de la hipótesis que las lipasas se encuentran en un cierto equilibrio entre una conformación cerrada y una conformación abierta que les permite ser catalíticamente activas en ausencia de interfaces hidrofóbicas. Por lo tanto, teniendo en cuenta el gran número de fuerzas intermoleculares implicadas en el mantenimiento de una u otra conformación, la modificación en el mecanismo de apertura y cierre de la lipasa, podría dar lugar a cambios estructurales en la forma exacta del centro activo de la enzima.

Los objetivos específicos fueron:

- Realizar modificaciones químicas específicas y dirigidas en fase sólida sobre aminoácidos superficiales CalB.
- Evaluar el efecto de la inmovilización reversible como estrategia de estabilización de proteínas para modificaciones químicas en fase sólida.
- Determinar el efecto de las diferentes modificaciones químicas sobre las propiedades funcionales y estructurales de los nuevos derivados de CalB inmovilizados de manera reversible.
- Evaluar la enantioselectividad de los nuevos biocatalizadores de CalB obtenidos en la hidrólisis del mandelato de metilo.

2. MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE CALB POR MODIFICACIÓN EN FASE SÓLIDA CON ÁCIDO TRINITRO-BENCENSULFONICO (TNBS) Y ETILENDIAMINA (EDA)

2.1 INTRODUCCIÓN

La lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) es una de las enzimas con mayor aplicación en biocatálisis, debido a su amplia especificidad e incluso en algunos casos una alta regio / enantioselectividad y estabilidad en diferentes medios de reacción.

La CALB sufre un complejo cambio conformacional durante la catálisis, que altera la estructura entre la conformación cerrada y la conformación abierta, con grandes variaciones alrededor de su centro activo (Derewenda y col., 1994; Guncheva y Zhiryakova, 2011). La flexibilidad del centro activo, hace posible pensar que la alteración del mecanismo de apertura y cierre, puede ocasionar un cambio drámico en las propiedades catalíticas de CALB. Para alcanzar este propósito se pueden utilizar diferentes estrategias que incluyen la modificación química de enzimas.

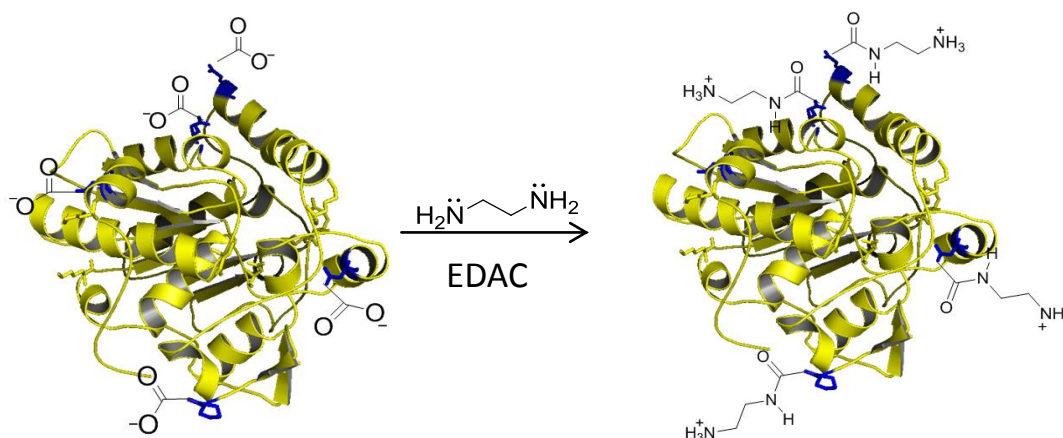
En general, es posible realizar diferentes modificaciones químicas dependiendo de los grupos funcionales que se introduzcan a la superficie enzimática. Entre las modificaciones químicas se encuentran:

2.1.1 Aminación química de grupos carboxilo con etilendiamina (EDA). 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 15**) (Carraway y Koshland, 1966; Bogdanov y col., 1988; López-Gallego y col., 2005; Grazú y col., 2006).

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 aminos además de ser mucho más reactivos, permiten realizar reacciones de modificación a valores de pH más bajos (Geoghegan, 2001; Khajeh y col., 2001; Fernández-Lafuente y col., 2003; López-Gallego y col., 2005; Rodrigues y col., 2009; Cowan y Fernández-Lafuente, 2011; Díaz-Rodríguez y Davis, 2011).

Figura 15. Aminación química de los grupos carboxilo de la superficie enzimática de CALB. Software de visualización Pymol 0.99. La estructura de la CALB fue tomada de Protein Data Bank (COD pdb 1TCA).



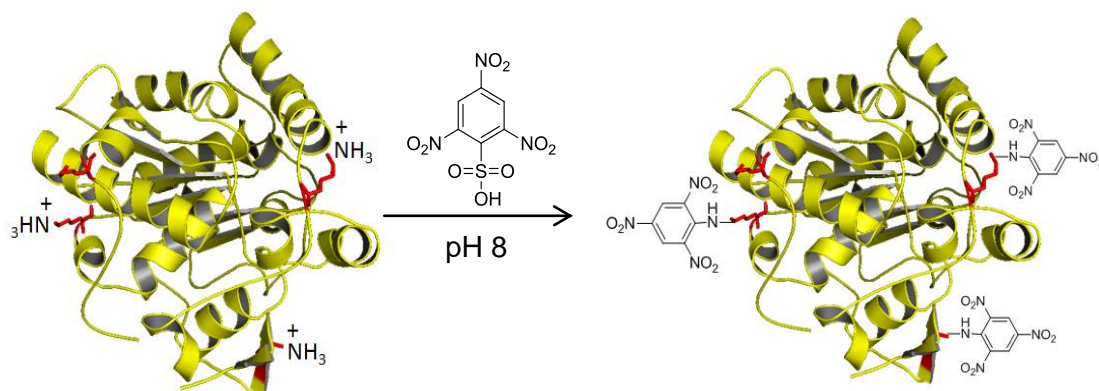
2.1.2 Modificación con ácido (2, 3, 4)- trinitro-bencen-sulfónico (TNBS). El tratamiento de proteínas y soportes para inmovilización con TNBS ha sido una estrategia usualmente empleada para la titulación y cuantificación de grupos amino primarios (Snyder y Soboconski, 1975). Sin embargo, ha sido poco utilizada

para modular las propiedades biocatalíticas de las enzimas. En la literatura se encuentran algunos estudios que han demostrado su efectividad en este sentido. Por ejemplo, la modificación de la invertasa de *Saccharomyces* con TNBS y la posterior inmovilización ocasionó un moderado incremento en la estabilidad de la enzima (Husain y col., 1996). Un efecto similar provocó la modificación de la α -amilasa con TNBS, en cuyo caso ocasionó cambio en la especificidad de la enzima frente a diferentes sustratos (Yamashita y col., 1993).

La modificación de los grupos amino con TNBS puede producir un aumento en la hidrofobicidad de la superficie de la enzima, al generar una amina secundaria con un grupo hidrofóbico como sustituyente (**figura 16**). Por esta razón, el TNBS ha sido empleado con éxito en el diseño de soportes hidrofóbicos usados en la inmovilización de lipasas (Mendes y col., 2011). Teniendo en cuenta que las modificaciones químicas de CALB con EDA y TNBS pueden ocasionar un cambio conformacional general en la estructura de la enzima al impedir los movimientos del lid y con ello posiblemente alterar la forma exacta del centro activo de la enzima.

El principal objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de las modificaciones con EDA y TNBS sobre las propiedades biocatalíticas de CALB.

Figura 16. Modificación de los grupos amino primarios de la CALB con TNBS. Software de visualización Pymol 0.99. La estructura de la CALB fue tomada de Protein Data Bank (COD pdb 1TCA).



2.2 MATERIALES

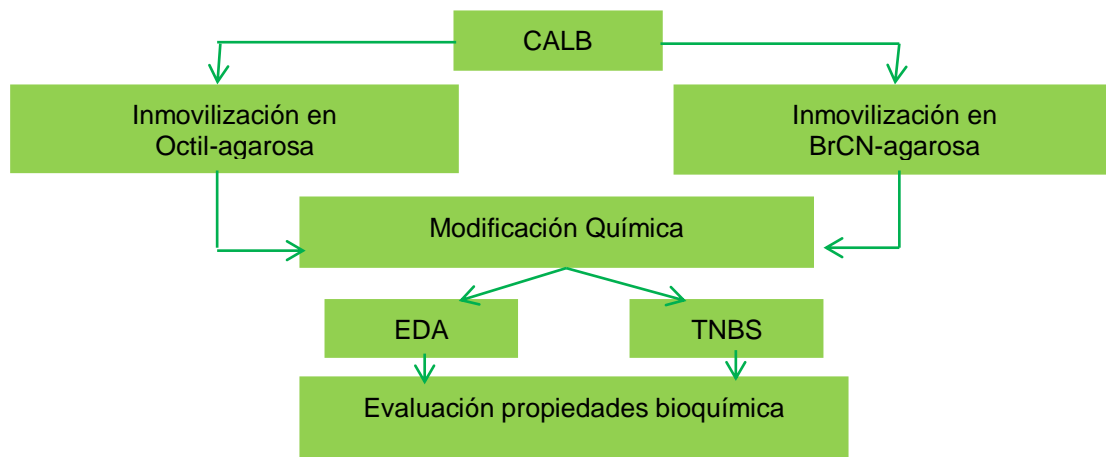
La CALB fue obtenida de Novozymes (Madrid, España). El Octil agarosa 4BCL, Tritón X-100, p-nitrofenilbutirato (pNPB) fueron obtenidos de Sigma Aldrich (St. Louis, Mo, USA). Los marcadores de peso molecular de proteínas para electroforesis de proteínas 1D se obtuvieron de Fermentas. Los reactivos utilizados en la síntesis y en las reacciones fueron grado analítico y suministrados por Sigma Aldrich y Merck.

2.3 MÉTODOS EXPERIMENTALES

En la **figura 17** se presenta el esquema de la metodología general propuesta para el logro de los objetivos. Inicialmente, la CALB fue inmovilizada mediante dos estrategias: i) Por adsorción sobre el soporte octil agarosa y ii) de manera covalente en el soporte bromuro de cianógeno-agarosa. Una vez obtenidos los

derivados de CALB, estos fueron sujetos a modificaciones sucesivas con EDA y TNBS. Finalmente, se evaluó el efecto de las modificaciones químicas sobre las propiedades bioquímicas de los derivados.

Figura 17. Metodología propuesta para el estudio de la modificación en fase sólida por aminación y TNBS.



2.3.1 Inmovilización de la CALB sobre diferentes soportes

2.3.1.1 Inmovilización y purificación de CALB por adsorción hidrofóbica sobre Octil-agarosa (OC). CALB fue inmovilizada y purificada sobre el soporte OC a baja fuerza iónica como lo describe Bastidas y col., 1998. Para ello, 2 ml del extracto comercial de CALB, con una concentración de proteína de 5.9 mg/ml y una actividad específica de 4.9 U/mg, fueron diluidos en 198 ml de buffer fosfato de Sodio 5 mM de pH 7. A continuación, se adicionaron 20 gramos secos de soporte OC. Periódicamente, se extrajeron muestras de suspensión y sobrenadante de inmovilización y se determinó actividad enzimática en la hidrólisis de p-NPB de acuerdo con lo descrito en el numeral 4.2 de la sección métodos analíticos. Después de 3 horas a 4 °C, bajo agitación constante a 250 rpm, la suspensión de inmovilización fue filtrada y la lipasa inmovilizada fue lavada 3

veces con agua destilada y buffer fosfato de sodio 25 mM de pH 7. Este derivado se abrevió como OC-CALB.

2.3.1.2 Inmovilización de CALB sobre el soporte Bromuro de Cianógeno agarosa (BrCN). Antes de llevar a cabo la inmovilización en BrCN, el soporte fue sometido a un tratamiento de hidratación en medio ácido. Se suspendieron 6 g soporte seco en 42 mL de una solución de HCl 1 mM durante 15 minutos bajo agitación constante. Posteriormente, el soporte fue lavado en exceso con una solución de bicarbonato 100 mM y NaCl 500 mM, pH 8.3. Posteriormente, el soporte activado fue resuspendido en 100 mL de solución enzimática de CALB (1 mL del extracto comercial de CALB diluido en 99 mL de buffer fosfato de sodio 5 mM de pH 7) a 4 °C, manteniendo agitación suave. Periódicamente, se extrajeron muestras de suspensión y sobrenadante durante la inmovilización y se determinó concentración de proteína y actividad enzimática en la hidrólisis de p-PNPB de acuerdo a lo descrito en el numeral 4.2. Después de una hora, el derivado enzimático fue filtrado al vacío y lavado con una solución de bicarbonato de sodio 100 mM y NaCl 500 mM a pH 8.3. Finalmente el derivado fue bloqueado con 10 mL de etanolamina 1M a pH 8 durante 2h a 25 °C. Posteriormente fue lavado con una solución de fosfato de sodio 25 mM pH 7 y almacenado a 4 °C. El derivado se denominó BrCN-CALB.

2.3.2 Modificación química en fase sólida de CALB con EDA y TNBS

2.3.2.1 Aminación en fase sólida de CALB. Para la aminación de la superficie proteica de CALB en fase sólida, la lipasa fue inmovilizada sobre los soportes OC y BrCN como se describió anteriormente en los numerales 2.1.1.1 y 2.1.1.2.

Los derivados OC-CALB (10 g) y BrCN-CALB (10 g) fueron incubados en 100 mL de una solución de etilendiamina (EDA) 1M a pH 4.75 bajo agitación constante en un agitador de rodillos. La reacción de modificación se inició con la adición de

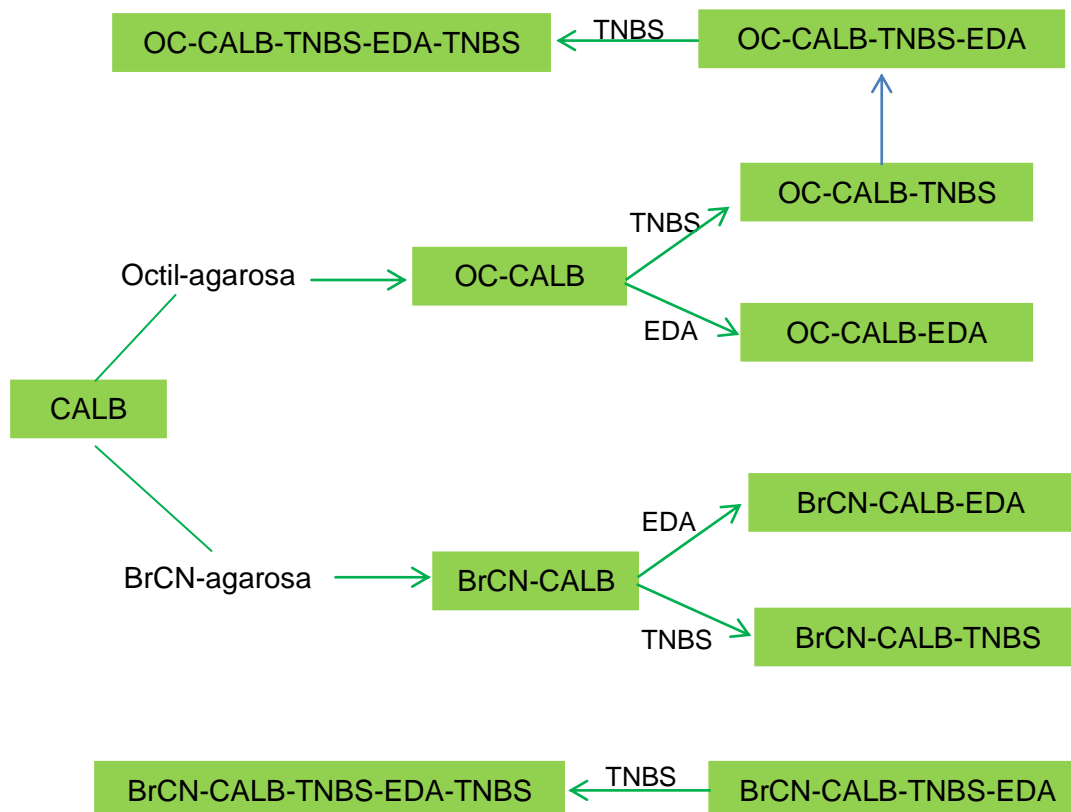
carbo-di-imida (EDAC) 10 mM. Después de 90 minutos de agitación a temperatura ambiente, los derivados aminados de CALB se lavaron con buffer fosfato 25mM, pH 7 y un exceso de agua destilada. Posteriormente, se filtraron al vacío y se almacenaron a 4 °C (Carraway y Koshland, 1966; Cabrera y col., 2009; Rodrigues y col., 2009). Una vez obtenidos los derivados de CALB modificados por aminación, fueron incubados en hidroxilamina-HCl 1M a pH 7 durante aproximadamente 1h a 25 °C para regenerar los residuos hidroxilo de las tirosinas que hubieran resultado afectados por el proceso de modificación química (Carraway y Koshland, 1968; Geoghegan, 2001; Hermanson, 2008). Finalmente, la concentración de grupos amino introducidos fue determinada por titulación con el ácido 2,3,4-trinitro-bencensulfónico, de acuerdo a lo descrito en la sección 4.3. Estos derivados se abreviaron como OC-CALB-EDA y BrCN-CALB-EDA.

2.3.2.2 Modificación de grupos amino primarios de CALB con TNBS. 12 gramos de derivado OC-CALB fueron incubados en 100 mL de una solución de TNBS 0.1% (p/v) en buffer fosfato de sodio 100 mM, pH 8 durante 60 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, el derivado enzimático modificado fue filtrado y lavado con un exceso de agua destilada (Snyder y Sobocinski; 1975). La intensidad de color en el derivado CALB no incrementó cuando se duplicaron la concentración y el volumen de TNBS, sugiriendo que el 100% de los grupos amino primarios expuestos en la superficie de la proteína habían sido modificados. El derivado obtenido se denominó OC-CALB-TNBS.

El procedimiento anterior fue utilizado para la modificación de los derivados OC-CALB-TNBS-EDA, BrCN-CALB y BrCN-CALB-TNBS-EDA. Una vez modificados los derivados con TNBS fueron nombrados como: OC-CALB-TNBS-EDA-TNBS, BrCN-CALB-TNBS y BrCN-CALB-TNBS-EDA-TNBS.

La **figura 18** muestra las modificaciones secuenciales con EDA y TNBS realizadas sobre los derivados de CALB inmovilizados sobre Octil-agarosa y Bromuro de Cianógeno-agarosa.

Figura 18. Derivados de CALB obtenidos a través de modificaciones secuenciales con EDA y TNBS en fase sólida.



2.3.3 Evaluación de la estabilidad de los derivados CALB obtenidos mediante modificaciones secuenciales con EDA y TNBS en fase sólida.

2.3.3.1 Estabilidad térmica. La estabilidad térmica de los derivados OC-CALB y BrCN-CALB modificados con EDA y TNBS, fue evaluada a 60 °C. Para ello, 1 gramo de derivado de CALB, fue suspendido en 10 ml de buffer de acetato de sodio 50 mM, pH 5 e incubado a 60°C. Periódicamente se extrajeron 100 µL de

suspensión y se determinó la actividad residual usando como sustrato p-NPB de acuerdo con lo descrito en la sección de métodos analíticos, numeral 4.2. Todas las medidas se realizaron por triplicado y los errores experimentales siempre fueron menores al 10%.

El procedimiento fue repetido, incubando los derivados de CALB en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7 a 60 °C y en buffer borato de sodio 50mM de pH 9 a 50 °C.

2.3.3.2 Estabilidad en presencia de dioxano. 1 gramo de derivado CALB fue incubado a 45°C en una mezcla de 50% (v/v) de dioxano/ buffer Tris-HCl 100mM a pH 5, pH 7 y pH 9. Periódicamente, se extrajeron 100 µL de suspensión y se evaluó la actividad residual usando como sustrato p-NPB de acuerdo a lo descrito en la **sección 4.2**. La presencia de cantidades inferiores a 50 µL de cosolvente orgánico no afectó la velocidad de reacción enzimática observada en el ensayo de hidrólisis de p-NPB.

2.3.3 Efecto del pH sobre la Actividad catalítica de los derivados de CALB frente a la hidrólisis de p-nitrofenil-butirato (p-NPB). Se evaluó el efecto del pH sobre la actividad enzimática de los diferentes derivados de CALB, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.2, para la determinación de actividad usando como sustrato p-NPB y utilizando como solución buffer acetato de sodio 25 mM a pH 5 y pH 6; fosfato de sodio a pH 7 y pH 8 y borato de sodio 25 mM a pH 9 y pH 10.

2.3.4 Desorción de CALB del soporte OC. 1 gramo de derivado OC-CALB modificado secuencialmente con EDA y TNBS (OC-CALB, OC-CALB-EDA, OC-CALB-TNBS-EDA y OC-CALB-TNBS-EDA-TNBS) fue suspendido en 15 mL de buffer fosfato de Sodio 10 mM pH 7 y de manera progresiva se adicionó tritón X-100 hasta obtener una concentración final de 1.5 % (v/v). Cada adición de tritón se realizó a intervalos de 30 minutos, tiempo durante el cual se extraían 100 µL de

suspensión y de sobrenadante y se determinaba la actividad enzimática frente a p-NPB de acuerdo con lo descrito en el numeral 4.2.

Para contrarrestar los efectos del detergente sobre la actividad enzimática se utilizó como blanco de referencia, agarosa inerte y la misma cantidad de lipasa que fue usada en el tratamiento cuando se adsorbió sobre OC.

2.3.5 Evaluación de la Enantioespecificidad de los diferentes derivados de CALB en la reacción de hidrólisis de R y S-mandelato de metilo. La actividad enzimática y enantioespecificidad de los derivados CALB fue evaluada en la hidrólisis en medio acuoso de los enantiómeros R y S-mandelato de metilo como se describe a continuación:

A 50 ml de solución de Mandelato de metilo (R o S) 10 mM, pH 7, fueron adicionados 300 mg del respectivo derivado de CALB bajo agitación constante a 25 °C. Periódicamente, el progreso de la reacción fue monitoreado extrayendo a diferentes tiempos alícuotas del medio de reacción y analizando los productos formados y el sustrato consumido a través de HPLC en fase reversa, de acuerdo con lo descrito en el numeral 4.7, hasta obtener conversiones entre el 20-30%.

De manera similar las reacciones fueron realizadas a pH 5, usando como buffer de reacción acetato de sodio 50 mM y a pH 9 usando como solución buffer borato de Sodio 50 mM.

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.4.1 Estudio bioinformático de accesibilidad de los solventes a los aminoácidos de CALB susceptibles a modificación química. Previo a la modificación de la CALB con EDA y TNBS, se realizó un estudio teórico de la

accesibilidad de los agentes modificantes a los aminoácidos superficiales de la enzima. La estructura 3D de CALB fue tomada de *Protein Data Bank* (www.PDB.org) código 1TCA y modelada usando el software de visualización Pymol, versión 0.99. Los valores de accesibilidad de superficie (ASA) para los residuos aminoacídicos de CALB fueron calculados mediante el programa ASA-view de libre acceso web (<http://www.netasa.org/asaview>) (Shandar y col., 2004). De acuerdo a la accesibilidad del solvente, los residuos aminoacídicos susceptibles a modificación fueron clasificados como: ocultos, parcialmente expuestos y expuestos (Gilis y col., 1996; Gilis y Col., 1997).

2.4.2 Determinación de la actividad enzimática frente al p-nitrofenil-butirato (p-NPB). La actividad catalítica de CALB se cuantificó de forma continua a través del método de velocidades iniciales de reacción. El ensayo se llevó a cabo midiendo el aumento de absorbancia a 348 nm, producido por la formación del producto p-nitrofenol (coeficiente de extinción molar= $5150 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) generado por la hidrólisis de p-NPB 0.4 mM, disuelto en tampón fosfato sódico 25 mM, pH 7 a 25 °C. Para iniciar la reacción, 100 μL de solución lipásica se añadieron a 2.5 mL del sustrato. Una unidad internacional de actividad enzimática fue definida como la cantidad de lipasa que es necesaria para hidrolizar 1 μmol de p-NPB por minuto (IU) bajo las condiciones descritas anteriormente.

2.4.3 Determinación del grado de modificación de grupos carboxilo. El grado de modificación de los grupos carboxílicos fue determinado mediante la titulación de los grupos aminos primarios usando la metodología del ácido picril sulfónico (Snyder et al., 1975; Montes et al., 2006). A 350 mg de derivado enzimático CALB modificado se adicionaron 3 mL de solución de ácido picril sulfónico o TNBS 0.1% (p/v) a pH 8. Después de 30 minutos de reacción a temperatura ambiente, el derivado se lavó con agua destilada. 200 mg de derivado se resuspendieron en 2.1 mL de borato de sodio 1M pH 9 y la medición de absorbancia se llevó a cabo a 430 nm. Se usó como blanco de reacción OC libre de enzima.

2.4.4 Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes (nativa-PAGE). 100 mg del respectivo derivado enzimático (OC-CALB, OC-EDA, OC-TNBS, OC-TNBS-EDA y OC-TNBS-EDA-TNBS) fueron re-suspendidos en 1 ml de solución de Tritón X-100 al 1%(v/v) en buffer fosfato 10 mM pH 7 durante 24 horas a 4 °C. Una alícuota de 20 µL del sobrenadante fue mezclada en una relación 1/1 (v/v) con buffer de ruptura (Tris-HCl 62.5 mM de pH 6, glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol al 0.005 %(p/v)), y posteriormente analizada en geles de poliacrilamida de acuerdo con la metodología propuesta por Laemmli (1970), usando geles de corrido al 15 %(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 y usando marcadores de peso molecular (25 a 120 kDa). Los geles obtenidos fueron posteriormente escaneados con un densitómetro UMAX PowerLook 2100XL y visualizados a través del software PDQuest (Biorad).

2.4.5 Determinación del punto isoeléctrico de los derivados modificados de CALB. Teniendo en cuenta que las modificaciones químicas con EDA y TNBS, ocasionan un cambio en el balance de cargas sobre la superficie proteica de CALB, se determinó el punto isoeléctrico de las preparaciones OC-CALB, OC-CALB-EDA, OC-CALB-TNBS, OC-CALB-TNBS-EDA y OC-CALB-TNBS-EDA-TNBS. En cada caso la enzima previamente modificada fue desorbida del soporte de acuerdo con lo descrito en la sección 3.5.

2.4.5.1 Desorción de derivados de CALB modificados con EDA y TNBS del soporte Octil-agarosa. 250 mg del derivado CALB (OC-CALB, OC-CALB-EDA, OC-CALB-TNBS, OC-CALB-TNBS-EDA y OC-CALB-TNBS-EDA-TNBS) fueron incubados en 500 µL de tritón X-100 al 1% (v/v) en buffer fosfato de sodio 25 mM a pH 7 durante 1 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la suspensión fue centrifugada a 10000 rpm y 4 °C; posteriormente, el sobrenadante conteniendo la enzima separada del soporte fue recuperado y almacenado a 4 °C.

2.4.5.2 Remoción de sales y tritón X-100 de las preparaciones solubles de CALB modificadas con EDA y TNBS. Las preparaciones de CALB previamente modificadas (con EDA y TNBS) y desorbidas fueron tratadas mediante el protocolo sugerido por Wessel y Flugge, (1984), con el fin de remover las sales y el detergente tritón X-100. Una mezcla de 600 μ L de metanol y 100 μ L de cloroformo fue adicionada a 200 μ L de la respectiva preparación soluble de CALB (CALB-EDA, CALB-TNBS, CALB-TNBS-EDA y CALB-TNBS-EDA-TNBS). Posteriormente, se mantuvieron en agitación a 3000 rpm en vortex durante 30 min a 4 °C . Los precipitados proteicos obtenidos correspondientes a las preparaciones modificadas de CALB fueron resuspendidos en 40 μ L de buffer de lisis (urea 7M, tiourea 4M, CHAPS 4%, y anfólitos “portadores” al 1% en un rango de pH 3-10) durante una hora a temperatura ambiente con agitación constante. La concentración de proteína fue determinada usando el método de cuantificación de proteína DC de BIO-RAD (catálogo Bio-rad # 500-0119).

2.4.5.3 Electroforesis en dos dimensiones y tinción. La electroforesis en dos dimensiones fue realizada en el laboratorio de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) en Madrid (España), de acuerdo con el protocolo estandarizado por dicho grupo de investigación. Para ello, una alícuota de 10 μ g de cada muestra fue mezclada con buffer de rehidratación (Urea 7M, thiourea 2M, CHAPS 4%, anfólitos “portadores” pH 3-10 al 4%, DTT 10mM, solución de rehidratación DeStreak 1.2%) hasta obtener un volumen final de 200 μ L. Posteriormente fue aplicada sobre tiras portadoras de un gradiente de pH 3-10 (IPG) de 11 cm (General Electric, Healthcare).

La primera dimensión fue corrida a 0.075 mA/tira IPG en un isoelectroenfoque IPGphor IEF System (GE Healthcare) siguiendo un programa que incrementó el voltaje de manera progresiva así: 30 V/h por 8h, 60 V/h por 8h, 120 V/h por 1h, 250 V/h por 1h, 500 V/h por 1h, 1000V/h por 0:30h, gradiente lineal a 8000V en 0:30h, y 8000V/h hasta alcanzar 12000V/h.

Después de la primera dimensión, las tiras fueron equilibradas con tampón de equilibrio SDS (Tris 50mM pH 8,8, urea 6M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), DTT 1% (p/v) y trazas de azul de bromofenol) por 10 minutos. Posteriormente, las tiras fueron de nuevo equilibradas en buffer que contenía iodo-acetamida 4% (p/v) durante diez minutos adicionales.

La segunda dimensión (SDS-PAGE) fue llevada a cabo en geles *hand-cast* (1 mm, 8 cm x 7 cm) usando la cámara de electroforesis *criterion dodeca cell* (BIO RAD). 1.2 µL del estándar de proteínas preteñido *Novex Sharp* (Invitrogen) fueron transferidos a 2mm de papel de filtro 3MM que fue puesto sobre el gel cerca del extremo ácido de cada tira IPG. Los geles fueron corridos aproximadamente a 20 mA por gel.

Posteriormente, los geles fueron teñidos con tinción SYPRO Ruby de Invitrogen: fijación en metanol 10%/ ácido acético 7% por 30 minutos, incubado en solución de tinción SYPRO Ruby toda la noche, lavado en metanol 10%/ ácido acético 7% dos veces por treinta minutos cada lavado, y finalmente, lavados con agua por 10 minutos.

2.4.5.4 Análisis de imagen de los geles obtenidos. Los geles teñidos con tinción SYPRO Ruby fueron escaneados en un fluorímetro modo imagen Typhoon™ 9400 Variable (General Electric, Healthcare), equipado con un láser de excitación (verde) a 532 nm y un filtro de emisión a 610 nm con un ancho de banda de 30 nm (SYPRO Ruby, ROX, EtBr) y resolución de 100 µm. La configuración del tubo fotomultiplicador se modificó a 700 V para optimizar la sensibilidad del equipo.

2.4.6 Determinación del grado de hidrólisis en la reacción de R y S-mandelato de metilo mediante HPLC. El grado de hidrólisis 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 (25 x 0.4 cm) suministrada por Análisis Vinicos (España). Cada ensayo se realizó por triplicado. La fase móvil fue una mezcla isocrática de acetonitrilo y buffer fosfato de amonio 100 mM en proporción 25:75 a un flujo de 1,0 mL/min. La longitud de onda empleada en el análisis fue 230 nm. Los tiempos de retención fueron los siguientes: ácido mandélico, 3.2 min y mandelato de metilo, 8 min.

La actividad específica (AE) se definió como μmol de sustrato hidrolizado por minuto y por gramo de lipasa pura, y fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$AE = \frac{[S].c.v}{m.t}$$

Donde:

[S] = Concentración de sustrato (mM) ; c = grado de conversión ; v = volumen de reacción (mL) ; m = cantidad de derivado enzimático (g) ; t = tiempo de reacción (min).

2.4.7 Determinación del exceso enantiomérico (ee) y la Enantioselectividad (E) de una reacción irreversible. El ácido mandélico formado (P) a partir de la resolución por separado de los enantiómeros del mandelato de metilo (entre 20-30% de conversión) se analizó por HPLC como se describió en la sección 4.6.

La enantioselectividad (E) (parámetro que describe la selectividad de una resolución= razón enantiomérica) se calculó a partir de la relación entre las velocidades aparentes de la reacción enzimática de hidrólisis de cada uno de los enantiómeros puros (R y S) bajo las mismas condiciones de reacción realizadas en simultáneo.

A diferentes tiempos se tomaron muestras de la hidrólisis enzimática para monitorear la concentración de sustrato y de producto a lo largo de la reacción.

$$E = \frac{(K_{cat}/K_M)R}{(K_{cat}/K_M)S} \quad R, \text{ enantiómero reactante más rápido} \quad (\text{Eq.3})$$

El grado de conversión C, se determinó por la siguiente ecuación:

$$C = \frac{P - P_{t=0}}{S + P_{t=0}} \quad (\text{Eq.4})$$

Donde P es el ácido mandélico producido y S corresponde al sustrato inicial (éster).

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

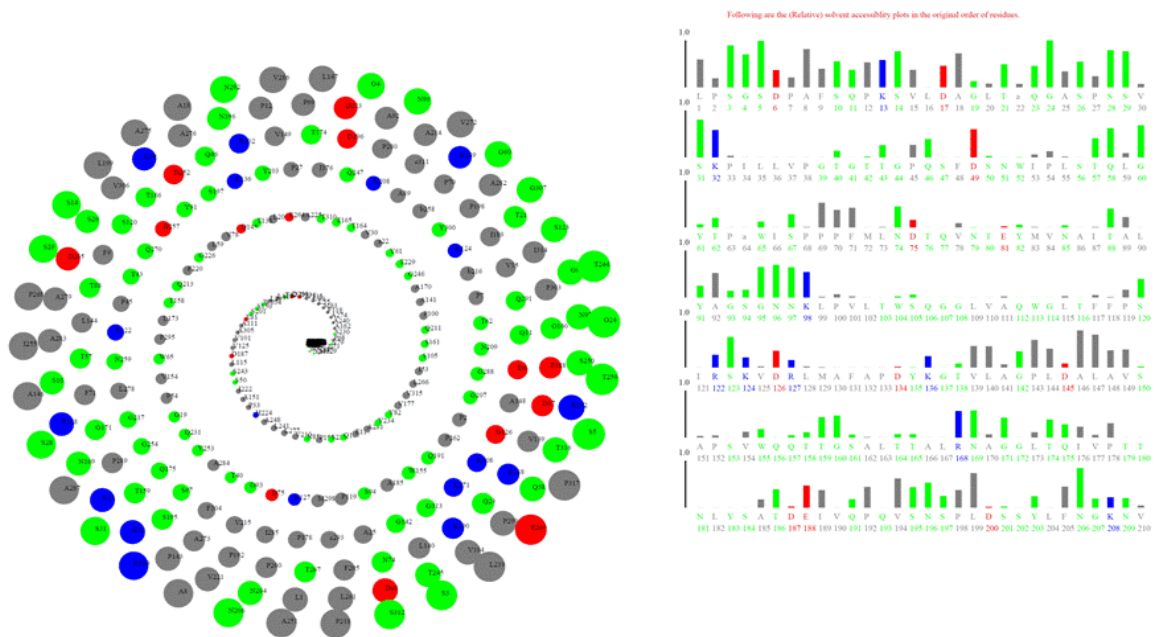
2.5.1 Estudio bioinformático de accesibilidad de EDA y TNBS a los aminoácidos de CALB susceptibles a modificación química. La figura 19, muestra el análisis de accesibilidad del medio de reacción a los diferentes residuos de ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu) y lisina (Lys), junto con el carboxilo y el amino terminal para la CALB.

En su estructura 3D, CALB exhibe 14 residuos de Asp, 4 residuos de Glu y un residuo de prolina (Pro) que corresponde al carboxilo terminal. Once residuos se encuentran altamente expuestos al medio de reacción, mientras que solo 4 se encuentran completamente aislados del medio. Esto significa que posiblemente 15 grupos carboxílicos son accesibles a la modificación química con etilendiamina (EDA).

La CALB tiene 9 residuos lisínicos y un residuo de Leucina (Leu) que corresponde al amino terminal. Todos los residuos se encuentran completamente accesibles al medio de reacción y por lo tanto son susceptibles a la modificación con TNBS. Además, la enzima cuenta con 8 residuos de Arginina, que aportan grupos

catiónicos que podrían no ser modificados por los agentes químicos utilizados en este estudio.

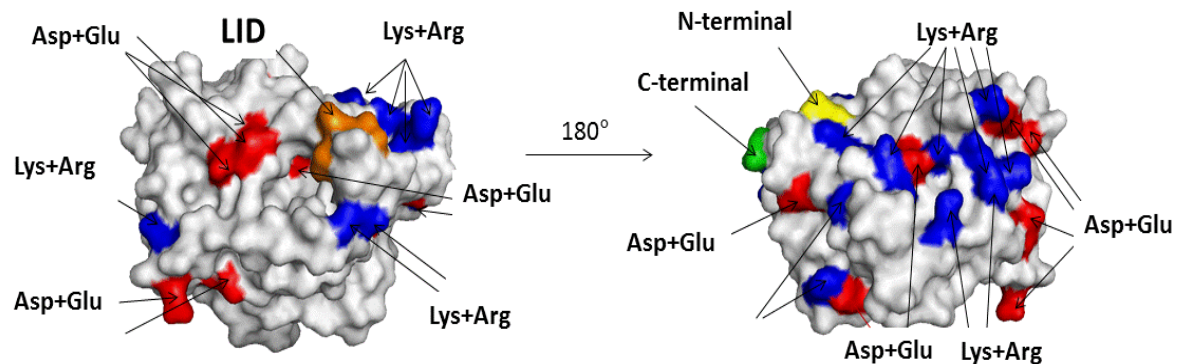
Figura 19. Análisis de accesibilidad del solvente (ASA) para los diferentes aminoácidos de CALB (código PDB 1TCA). A) *El espiral muestra los residuos aminoacídicos en orden de accesibilidad del solvente. Los residuos más accesibles se ubican en el exterior del espiral. El radio de los círculos sólidos representa la accesibilidad relativa del solvente a cada aminoácido.* B) *accesibilidad del disolvente a los residuos de CALB, con la secuencia de aminoácidos dispuestos en el orden original de su archivo PDB. La longitud de la barra represente la accesibilidad relativa ASA por unidad de área de superficie, por lo que 0 y 1 corresponden a los residuos totalmente aislados y expuestos, respectivamente.*



La **figura 20**, muestra los diferentes grupos que pueden ser modificados utilizando EDA y TNBS en la proximidad del *lid* y del centro activo de la enzima. Entre ellos, es importante señalar el Asp-145 que hace parte del *lid* (GLY-PRO-LEU-ASP-ALA), y que se encuentra a menos de 10 Å del residuo de Glu-294. Este último

grupo está muy cerca de la Lys-308 y Arg-309. Por tanto, las modificaciones químicas utilizadas en este trabajo podrían alterar las interacciones químicas en la zona próxima al centro activo, quizás alterando el movimiento del *lid* y de esta manera las propiedades bioquímicas de la lipasa. En un área diferente de la proteína, el Asp-187, el Asp-223 y el Glu-188 se encuentran también muy cerca de la región del lid, por lo que la modificación puede afectar los movimientos del *lid* de igual forma.

Figura 20. Modelo de estructura 3D de la superficie de CALB indicando los residuos lisínicos, los ácidos carboxílicos y las argininas. 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.



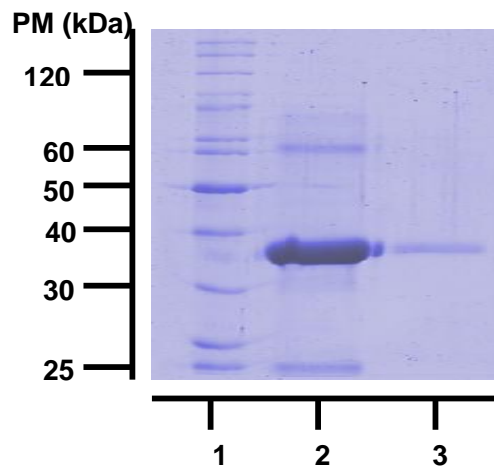
2.5.2 Inmovilización de CALB en el soporte OC y BrCN-agarosa. La CALB fue inmovilizada mediante dos protocolos de inmovilización diferentes. Un inmovilización incluyó su adsorción sobre el soporte hidrofóbico OC, y el otro su inmovilización covalente sobre BrCN-agarosa.

2.5.2.1 Purificación e Inmovilización de CALB en OC. La adsorción de lipasas sobre soportes hidrofóbicos a baja fuerza iónica constituye un eficiente método de purificación de este tipo de enzimas. La purificación de la CALB se realizó a través de la adsorción del extracto comercial de la enzima sobre geles de octil-agarosa a

baja fuerza iónica, obteniéndose una inmovilización cuantitativa y rápida, tal como se ha descrito en la literatura (Bastida et al., 1998).

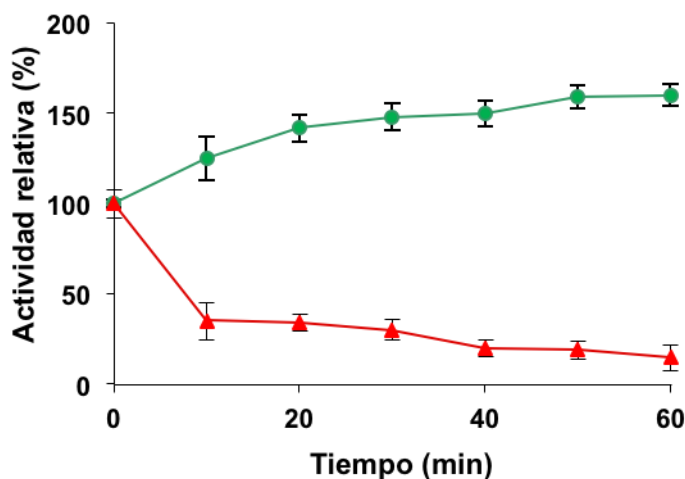
En la **figura 21** se muestra el perfil electroforético por SDS-PAGE de los extractos crudos de CALB antes y después de su purificación por cromatografía de adsorción interfacial sobre geles de octil-agarosa. Se puede observar que la CALB se adsorbió de forma específica sobre el soporte, presentándose una banda característica de 33 KDa, la cual corresponde al PM de la CALB en su forma monomérica (Kirk y Wurtz, 2002).

Figura 21. Electroforesis SDS-PAGE del preparado crudo y purificado de CAL-B. carriles: 1. Marcador de peso molecular. 2. Extracto comercial. 3. CALB purificada.



Por otra parte, la adsorción de lipasas sobre OC también es utilizada como una estrategia de inmovilización. En la **figura 22**, se describe la cinética de inmovilización de CALB sobre el soporte OC. Al cabo de una hora se observa un 95% de inmovilización de CALB, de acuerdo con las actividades enzimáticas en la suspensión y el sobrenadante. El 5% restante de actividad puede atribuirse a esterazas presentes en el extracto comercial de la CALB.

Figura 22. Curso de inmovilización de la CALB sobre soportes de Octil agarosa. La actividad en la suspensión y el sobrenadante fue determinada usando como sustrato *p*-NPB (0.4 mM) a pH 7, 25 mM y 25°C. (●) suspensión; (▲) sobrenadante.



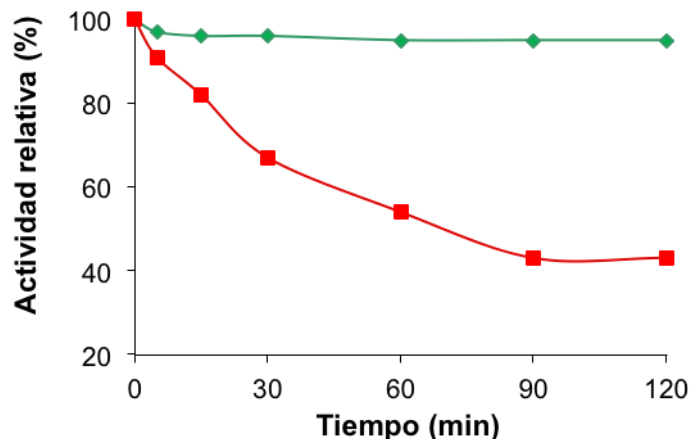
A partir de la **figura 22** se determinó que durante el proceso de inmovilización se presentó un aumento por un factor hasta de aproximadamente 1.5 veces la actividad enzimática en la hidrólisis de *p*-NPB. Este efecto de hiperactivación se ha observado cuando las lipasas son activadas interfacialmente 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 y col., 1998).

2.5.2.2 Inmovilización de CALB en el soporte BrCN-agarosa. Para la inmovilización de la CALB sobre el soporte agarosa activado con grupos bromuro de Cianógeno (BrCN), la enzima fue previamente purificada por adsorción interfacial sobre el soporte OC, de acuerdo con lo descrito en el numeral 3.1.1.

La inmovilización de CALB sobre BrCN-agarosa se realizó a pH 7 y 4 °C. Bajo estas condiciones, la enzima fue inmovilizada a través de la unión covalente unipuntual entre el grupo amino más reactivo de la proteína (posiblemente el amino

terminal) y el soporte. La **figura 23**, muestra el curso de inmovilización de CALB sobre el soporte BrCN-agarosa. Transcurridos 120 minutos el rendimiento de inmovilización de CALB fue del 57%, de acuerdo con las actividades enzimáticas en la suspensión y el sobrenadante. La carga enzimática del derivado BrCN-CALB fue de 1.2 mg de proteína/g soporte.

Figura 23. Curso de inmovilización de la CALB sobre el soporte de BrCN-agarosa. La actividad en la suspensión y el sobrenadante fue determinada usando como sustrato *p*-NPB (0.4 mM) a pH 7, 25 mM y 25°C. (●) suspensión; (▲) sobrenadante.



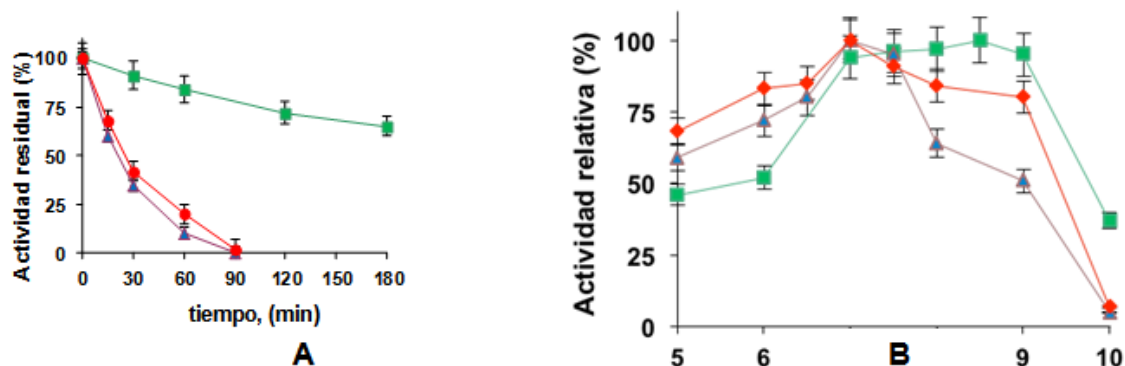
2.5.3 Estabilidad térmica y efecto del pH sobre la actividad enzimática de los derivados OC-CALB, BrCN-CALB. La **figura 24a**, muestra los cursos de inactivación térmica de las preparaciones de CALB soluble e inmovilizada por adsorción y por unión covalente de acuerdo con la metodología descrita en el numeral 3.3.1. Trascorridos 90 minutos de incubación a 60°C, los derivados OC-CALB y BrCN-CALB fueron más estables que la enzima soluble en un 72 y 70%, respectivamente. Los resultados sugieren que el derivado interfacialmente adsorbido (OC-CALB) es más estable que el derivado BrCN-CALB debido a que la inmovilización en Octil agarosa estabiliza la forma abierta de la enzima, mientras que la inmovilización sobre BrCN-agarosa se da mediante unión covalente uni-

puntual lo que permite una mayor flexibilidad de la estructura terciaria de la enzima, muy similar a la de la enzima en forma soluble (Mateo y Col., 2005; Mateo y Col., 2007; Fernandez-Lorente y Col., 2008; Rodrigues y Col., 2009;).

La **figura 24B** muestra el efecto del pH sobre la actividad de hidrólisis del p-NPB de los derivados OC-CALB y BrCN-CALB, de acuerdo con la metodología descrita en el numeral 3.4. La CALB soluble y BrCN-CALB exhibieron la actividad máxima en el rango de valores de pH entre pH 7 y pH 7.5, y se inactivaron por completo a pH 10, mientras que el derivado OC-CALB presentó la actividad máxima en el rango de pH 8.5-9 y conservó aproximadamente el 30% de la actividad a pH 10.

Las diferencias en el perfil pH/actividad (**Figura 24b**) de los derivados CALB se debieron posiblemente a que en el derivado OC-CALB, el equilibrio conformacional de la lipasa se desplazó fijando mayoritariamente la forma abierta sobre el soporte, mientras que en el derivado BrCN-CALB, es posible que la enzima se encontrara inmovilizada con una conformación mayoritariamente "cerrada" (aunque el *lid* no aísla por completo el centro activo de la enzima). Por lo tanto, si el movimiento del lid era de algún modo más restringido a valores de pH alcalino que a valores de pH neutro, la inmovilización de CALB sobre BrCN arrojó una forma menos activa de la enzima, que podría justificar las diferencias entre las actividades de ambas preparaciones enzimáticas en valores de pH alcalino.

Figura 24. Cursos de inactivación térmica (A) y perfil pH/Actividad (B) para los derivados de CALB. La inactivación térmica (A) se realizó a pH 7 y 60°C, usando como sustrato p-NPB 0.4 mM para determinar la actividad residual. (B) el 100% de actividad relativa es la actividad máxima de cada preparación. (▲)CALB; (●) BrCN-CALB; (■) OC-CALB.



2.5.4 Efecto de la modificación química con EDA y TNBS sobre la actividad de CALB inmovilizada sobre OC y BrCN frente al p-NPB. Las condiciones de modificación descritas en la sección de métodos experimentales, numeral 4.3, permitieron modificar el 100% de los grupos amino primarios (10 grupos) y grupos carboxílicos (15 residuos) expuestos.

La **tabla 1** muestra los cambios en la actividad frente al p-NPB (a pH 7) de los derivados OC-CALB y BrCN-CALB producidos por la modificación química secuencial con EDA y TNBS. Los resultados son diferentes dependiendo de la preparación de CALB inmovilizada y del agente modificante empleado. La aminación del derivado OC-CALB produjo un incremento en la actividad frente al p-NPB de 40%, mientras que la modificación con TNBS del mismo derivado produjo una disminución del 20% en la actividad frente p-NPB.

Usando el derivado BrCN-CALB, la modificación química con EDA y con TNBS produjo una disminución dramática en la actividad enzimática frente al p-NPB,

siendo más significativo el efecto adverso cuando se usó EDA (la actividad decreció alrededor del 50%) que cuando se utilizó TNBS (la actividad disminuyó 40%).

Las diferencias generadas por la modificación química con EDA o TNBS, según sea el derivado de CALB usado, pueden deberse a varias causas. Por ejemplo, es posible que algunos grupos de CALB ubicados en un ambiente altamente hidrofóbico e implicados en la adsorción de la enzima al soporte OC (como el Asp-145, que se encuentra en el *lid*) no hayan sido modificados por el agente hidrofílico (EDA), permitiendo una mayor recuperación de la actividad enzimática (Hernández y Fernández-Lafuente, 2011; Hernández, y col., 2011). Otra posibilidad, es que mientras la lipasa adsorbida sobre OC, desplace y fije el *lid* estabilizando la conformación abierta, la CALB inmovilizada de manera covalente tiene el *lid* completamente libre para moverse. Aunque el centro activo de CALB inmovilizado en BrCN no esté completamente aislado del medio, es probable que después de la modificación química, algunos movimientos del *lid* se encuentren restringidos por impedimentos estéricos de manera que el efecto final de la modificación es una disminución en la actividad enzimática.

La posterior modificación con EDA de los derivados OC-CALB-TNBS y BrCN-CALB-TNBS, altera el balance de cargas sobre la superficie enzimática al cambiar grupos aniónicos (grupos carboxilos ionizados) por grupos catiónicos (grupos amino ionizados), ocasionando probablemente un cambio conformacional en la enzima. En este sentido, la aminación del derivado OC-CALB-TNBS incrementó la actividad enzimática del nuevo derivado OC-CALB-TNBS-EDA en la hidrólisis del pNPB en un 15% y 30% en comparación con los derivados OC-CALB y OC-CALB-TNBS, respectivamente.

El efecto final de la modificación con EDA fue diferente cuando se utilizó el derivado BrCN-CALB-TNBS. La actividad del nuevo derivado BrCN-CALB-TNBS-

EDA frente al pNPB disminuyó 41% y 5% con relación a los derivados BrCN-CALB y BrCN-CALB-TNBS, respectivamente (**tabla 1**). La disminución en la actividad de los derivados de CALB inmovilizados de forma covalente con EDA se debieron posiblemente a que la modificación pudo haber cambiado algunas interacciones electrostáticas existentes entre el *lid* y el área del centro activo de la proteína, por fuerzas de repulsión. Por ejemplo, es posible que la aminación de los residuos Asp-145 y Glu-294, o la modificación con TNBS del residuo de Lys-308 haya ocasionado algún efecto sobre el movimiento del *lid*.

Los derivados OC-CALB-TNBS-EDA y BrCN-CALB-TNBS-EDA fueron modificados con TNBS. La modificación puede ocasionar un incremento en la hidrofobicidad de la enzima, ya que implica la introducción de 15 grupos trinitrobencil más (25 grupos TNBS en total) sobre la superficie de CALB. Los resultados obtenidos señalan que el derivado OC-CALB-TNBS-EDA-TNBS fue 30% y 60% menos activo en la hidrólisis de pNPB que los derivados OC-CALB y OC-CALB-TNBS-EDA, respectivamente. Por su parte, la modificación del derivado de CALB inmovilizado de manera covalente BrCN-CALB-TNBS-EDA no afectó de forma significativa la actividad enzimática frente a pNPB del nuevo derivado.

Las diferencias de actividad encontradas entre los derivados OC-CALB-TNBS-EDA-TNBS y BrCN-CALB-TNBS-EDA-TNBS se deben posiblemente a que mientras en el derivado inmovilizado por adsorción interfacial la modificación con TNBS ocasionó cambios en las interacciones existentes entre los residuos Asp-167, Glu-223 y Glu-188 alterando desfavorablemente la forma del centro activo, en el derivado inmovilizado covalentemente es probable que la modificación no haya tocado los residuos anteriormente mencionados.

Tabla 1. Actividad relativa de los diferentes derivados de CALB modificados con TNBS y EDA en la hidrólisis de pNPB (0.4 mM) a pH 7 y 25°C. 100% corresponde a la actividad relativa del derivado de CALB no modificado. Los experimentos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección métodos analíticos, numeral 4.2.

DERIVADO	ACTIVIDAD RELATIVA				
	CALB	CALB-EDA	CALB-TNBS	CALB-TNBS-EDA	CALB-TNBS-EDA-TNBS
OC	100	140 ± 3	83 ± 4	115 ± 5	70 ± 2
BrCN	100	49 ± 2	63 ± 3	59 ± 2	58 ± 1

Considerando que los derivados de OC-CALB modificados con TNBS y EDA retuvieron el mayor porcentaje de su actividad enzimática, y además, exhibieron una mayor estabilidad en comparación con los derivados modificados de BrCN-CALB, los estudios que se describen a continuación se realizaron solo con los derivados de OC-CALB.

2.5.5 Efecto del pH sobre la actividad hidrolítica de los derivados OC-CALB modificados con TNBS y EDA frente al p-NPB. La figura 25 muestra el efecto del pH sobre la actividad de los 5 derivados de OC-CALB modificados con EDA y TNBS. Sobresalen las diferencias en el valor del pH óptimo entre el derivado OC-CALB-EDA que exhibió la máxima actividad a pH 7 y el derivado no modificado OC-CALB que presentó la máxima actividad a pH 9.

El derivado OC-CALB-EDA presentó mayor actividad en todo el rango de pH estudiado (rango de pH 5-10) en comparación con el derivado no modificado. El derivado OC-CALB-EDA, presentó un marcado efecto de hiperactivación, con respecto al derivado no modificado a valores de pH entre pH 5 y pH 7. Por

ejemplo, a pH 5 y pH 6, la actividad de OC-CALB-EDA se incrementó 180% y 170% en comparación con la actividad del derivado OC-CALB frente al pNPB (**Figura 25**). Sin embargo, a pH 10, donde la enzima no modificada disminuyó su actividad un 65%, el derivado OC-CALB-EDA retuvo el 44% de la actividad máxima exhibida a pH 7.

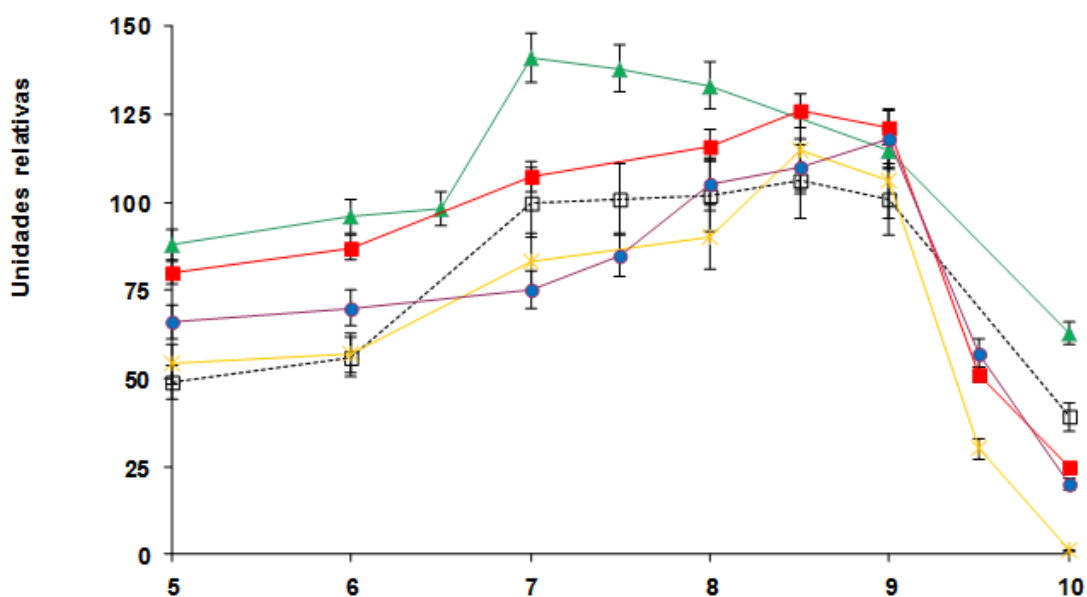
El derivado OC-CALB-TNBS-EDA, a pH 5, incrementó en un 60% la actividad enzimática en comparación con la enzima no modificada. En el rango de pH entre pH 7 y pH 9 este incremento estuvo entre el 10% y 15% en comparación con OC-CALB, y entre 30% y 40% cuando se comparó con el derivado OC-CALB-TNBS. A pH 10, el derivado OC-CALB-TNBS-EDA fue menos activo que OC-CALB-EDA y OC-CALB, reteniendo tan solo el 20% de su actividad máxima.

El incremento en la actividad enzimática de los derivados OC-CALB-EDA y OC-CALB-TNBS-EDA frente a la hidrólisis de pNPB en el rango de pH 5 a pH 8 en comparación con el derivado no modificado OC-CALB, se debió posiblemente a que el tratamiento con EDA generó una conformación estructural de la enzima más favorable al modificar los residuos Asp-187, Asp-223 y el Glu-188 (**figura 20**) que se encuentran muy cerca de la región del lid, afectando los movimientos del mismo y cambiando la forma exacta del centro activo. Sin embargo, a valores de pH 9 y 10, es posible que la actividad haya disminuido en comparación con OC-CALB debido a que los nuevos grupos amino introducidos sobre la superficie enzimática se encuentran desprotonados -tienen un valor de pK de 9.2- ocasionando la pérdida de interacciones electrostáticas que mantenían una conformación más activa (Rodrigues y col., 2009; Cabrera y col., 2009; Diaz-Rodriguez y Davis, 2010).

El derivado OC-CALB-TNBS presentó una actividad muy similar al derivado no modificado OC-CALB en el rango de valores de pH estudiados (rango de pH 5-7). Las diferencias más notables se encontraron a pH 7, en donde el derivado OC-

CALB-TNBS disminuyó la actividad enzimática un 20% frente al pNPB, con respecto al derivado OC-CALB. A pH 10, el derivado OC-CALB retiene cerca del 30% de su actividad mientras que OC-CALB-TNBS se inactivó por completo. Finalmente, el derivado OC-CALB-TNBS-EDA-TNBS fue entre 20% y 30% menos activo que el derivado OC-CALB-TNBS-EDA, en todo el rango de pH estudiado. Estos resultados reafirman que la modificación con TNBS causó un efecto negativo sobre la actividad de CALB, debido probablemente a que con la introducción de los grupos trinitrobencil se rompieron interacciones electrostáticas importantes para el mantenimiento de una conformación de la enzima más activa.

Figura 25. Influencia del valor del pH sobre la actividad de los diferentes derivados modificados de OC-CALB. Los experimentos se realizaron a 25 °C, usando p-NPB 0.4 mM como sustrato, de acuerdo a lo descrito en la sección de materiales y métodos. 100 unidades relativas corresponden a la actividad del derivado no modificado OC-CALB a pH 7. (□) OC-CALB (▲) OC-CALB-EDA; (x) OC-CALB-TNBS (■) OC-CALB-TNBS-EDA; (●) OC-CALB-TNBS-EDA-TNBS.



2.5.6 Estabilidad de los derivados de OC-CALB modificados con TNBS y EDA

2.5.6.1 Efecto de las modificaciones químicas con EDA y TNBS sobre la estabilidad térmica de los derivados de OC-CALB. La **tabla 2** muestra los tiempos de vida media de los derivados de OC-CALB modificados con TNBS y EDA, bajo diferentes condiciones de inactivación. Las inactivaciones térmicas realizadas sobre el derivado OC-CALB a pH 5, pH 7 y pH 9, mostraron que la enzima no modificada es altamente estable a pH 5, mientras que a pH 9 su tiempo de vida media fue corto, incluso a una temperatura más baja (50 °C a pH 9 y 60 °C a pH 5 y pH 7).

La modificación con EDA produjo una disminución en la estabilidad de CALB en los valores estudiados de pH 5, 7 y 9. A pH 7, la estabilidad decreció en un factor de 5 en comparación con el derivado OC-CALB, mientras que a valores de pH 5 y 9 disminuyeron en un factor de 1.35 y 1.4, respectivamente.

La modificación con TNBS redujo la estabilidad del derivado OC-CALB a pH 5 en un factor de 2 y a pH 7 en un factor de 1.6. Sin embargo, a pH 9 esta modificación incrementó la estabilidad de OC-CALB por un factor de 1.4. Comparando la estabilidad del derivado modificado con EDA (OC-CALB-EDA) con el derivado OC-CALB-TNBS, la modificación química únicamente con TNBS produjo derivados menos estables a pH 5.

El derivado OC-CALB-TNBS-EDA fue menos estable que el derivado OC-CALB-TNBS a pH 7 y pH 9, en un 28% y 52%, respectivamente. Sin embargo, a pH 5, el derivado OC-CALB-TNBS-EDA fue 28% más estable que OC-CALB. Por su parte, el derivado OC-CALB-TNBS-EDA-TNBS fue el biocatalizador menos estable bajo las condiciones estudiadas. Esto sugiere que el aumento en la hidrofobicidad de la superficie de CALB ocasionada por la modificación con TNBS, produce un efecto

desestabilizante sobre la enzima debido probablemente a que con la introducción de los grupos trinitrobencil se rompieron interacciones electrostáticas que contribuían en la estabilidad de la estructura 3D de la enzima (Ueji y col., 2003; Rodrigues y col., 2011).

La estabilidad de los derivados OC-CALB, OC-CALB-EDA, OC-CALB-TNBS, OC-CALB-TNBS-EDA y OC-CALB-TNBS-EDA-TNBS fue evaluada de forma similar a 37°C. En este caso, todos los derivados de OC-CALB modificados mantuvieron cerca del 95% de sus actividades después de una semana de incubación.

Tabla 2. Tiempos de vida media (horas) de los diferentes derivados modificados de OC-CALB bajo diferentes condiciones de inactivación térmica. Los experimentos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 3.3.1.

DERIVADO	Tiempo de vida media (h)		
	pH 5, 60°C	pH 7, 60°C	pH 9, 50°C
OC-CALB	5 ± 0.15	4 ± 0.15	3.8 ± 0.15
OC-CALB-EDA	3.5 ± 0.15	0.8 ± 0.1	2.8 ± 0.2
OC-CALB-TNBS	2.5 ± 0.1	2.5 ± 0.15	5.3 ± 0.22
OC-CALB-TNBS-EDA	3.2 ± 0.15	1.8 ± 0.1	2.5 ± 0.1
OC-CALB-TNBS-EDA-TNBS	1.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1 ± 0.15

2.5.6.2 Estabilidad de los diferentes derivados modificados de OC-CALB en presencia de dioxano 50% (v/v). La estabilidad de los derivados modificados de CALB fue evaluada en presencia de una mezcla de 50% (v/v) de dioxano/ buffer Tris-HCl 100mM a valores de pH 5, 7 y 9 a 60°C, de acuerdo con lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 3.3.2.

Los resultados presentados en la **tabla 3** muestran que las modificaciones químicas produjeron un decrecimiento en la estabilidad de los diferentes derivados de CALB modificados con EDA y TNBS. En general, los tiempos de vida media de estos derivados se redujeron (sin exceder en un factor de 2) en comparación con el derivado no modificado OC-CALB. Las excepciones fueron el derivado OC-CALB-TNBS que fue 1.5 veces más estable a pH 7 y el derivado OC-CALB-TNBS-EDA que fue 1.6 veces más estable a pH 9.

De nuevo, el punto más relevante es que a pesar de las múltiples modificaciones químicas realizadas sobre la superficie de CALB, los derivados obtenidos retuvieron niveles aceptables (superiores a 50%) de estabilidad en presencia de dioxano. Los derivados de OC-CALB modificados con EDA y TNBS, fueron incubados a valores de pH 5, 7 y 9 a 25°C por una semana. Las actividades residuales de todas las preparaciones fueron superiores al 90%, destacando la elevada estabilidad a temperatura ambiente de los derivados de OC-CALB modificados.

Es posible que los efectos causados por las modificaciones químicas sobre la estabilidad del derivado OC-CALB, se deban a que las modificaciones químicas ocasionaron cambios drásticos en las interacciones entre los residuos que se encuentran sobre la superficie de la CALB y el microambiente que rodea la enzima.

Tabla 3. Tiempos de vida media (horas) de los diferentes derivados modificados de OC-CALB en presencia de Dioxano 50% (v/v) a diferentes valores de pH. Los experimentos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 3.3.2.

DERIVADO	Tiempo de Vida Media (h)		
	pH 5, 45°C	pH 7, 45°C	pH 9, 45°C
OC-CALB	2 ± 0.15	4.8 ± 0.15	1.8 ± 0.12

OC-CALB-EDA	1.5 ± 0.05	3.5 ± 0.15	1 ± 0.07
OC-CALB-TNBS	1.8 ± 0.1	5.5 ± 0.25	1 ± 0.05
OC-CALB-TNBS-EDA	0.9 ± 0.1	2.8 ± 0.1	3 ± 0.15
OC-CALB-TNBS-EDA-TNBS	1.5 ± 0.1	2.5 ± 0.15	2.5 ± 0.15

2.5.6.3 Estudio de la fuerza de adsorción de la enzima modificada sobre el soporte. Teniendo en cuenta que la modificación con TNBS produjo un incremento en la hidrofobicidad de la superficie de la CALB alterando la fuerza de adsorción de la enzima sobre el soporte octil-agarosa, se estudió el efecto de la modificación química sobre la fuerza de adsorción de la enzima en el soporte.

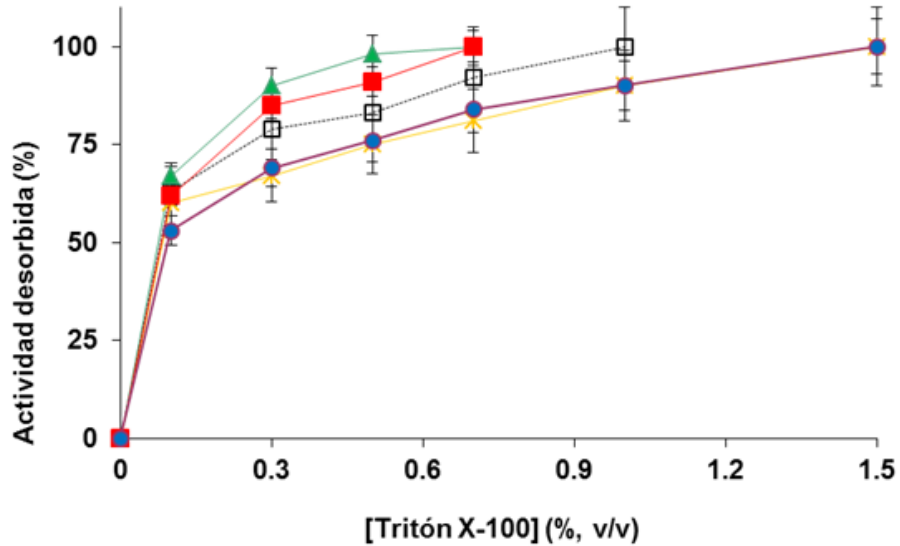
La **figura 26** muestra que la desorción de CALB del derivado OC-CALB-EDA requirió bajos porcentajes de tritón X-100, mientras que en el derivado OC-CALB-TNBS, se requirieron altas concentraciones del detergente. La explicación para este efecto, puede ser mucho más compleja que sólo el aumento en la hidrofobicidad de la superficie de CALB. Por ejemplo, el derivado OC-CALB-TNBS-EDA-TNBS es más hidrofóbico que el derivado OC-CALB-TNBS. Sin embargo, la curva de desorción de la enzima del soporte fue similar para ambos derivados.

En el caso de los derivados OC-CALB-TNBS y OC-CALB-TNBS-EDA, se esperaría un perfil similar de desorción de la enzima (del soporte) debido a que la aminación del derivado OC-CALB-TNBS no afectaría la hidrofobicidad de la superficie proteica a pH 7. Sin embargo, los resultados obtenidos no coincidieron con esta tendencia. La desorción de CALB del derivado OC-CALB-TNBS-EDA requirió una concentración notablemente más baja de detergente (tritón X-100 al 0.7% v/v) que la requerida para separar la enzima del derivado OC-CALB-TNBS (tritón x-100 al 1.5 % v/v). Para eliminar el posible efecto de que la modificación con EDA hubiese afectado al soporte octil-agarosa, el soporte fue incubado en presencia de EDC 10 mM y EDA 1 M y posteriormente utilizado para la

inmovilización de CALB. El perfil de desorción de la enzima inmovilizada sobre el soporte tratado con EDC y EDA no presentó diferencias significativas en comparación con la desorción de CALB del derivado OC-CALB, lo que sugiere que las diferencias en el perfil de desorción de CALB en los derivados OC-CALB-TNBS y OC-CALB-TNBS-EDA fueron consecuencia directa de la modificación química de la enzima, y no del soporte. Resultados similares a los obtenidos han sido publicados en la literatura. Por ejemplo, la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* modificada con EDA requirió una concentración mayor de detergente para liberarse del soporte que el derivado no modificado de la misma enzima (Galvis y Col., 2012).

En todos los casos, las preparaciones modificadas de CALB mantuvieron una alta afinidad de la enzima por el soporte Octil-agarosa. Inclusive, a pesar que el *lid* de CALB es pequeño en comparación con otras lipasas de origen microbiano (Verger, R., 1997; Jaeger y Reetz, 1998; Fernández-Lorente y Col., 2008) Estos resultados confirman la efectividad del soporte octil-agarosa para inmovilizaciones reversibles de CALB.

Figura 26. Perfil de desorción de las preparaciones modificadas de CALB del soporte Octil-agarosa. Los derivados de CALB fueron incubados en concentraciones crecientes de tritón X-100, como se describe en el numeral 3.5. (□) OC-CALB (▲) OC-CALB-EDA; (x) OC-CALB-TNBS (■) OC-CALB-TNBS-EDA; (●) OC-CALB-TNBS-EDA-TNBS.



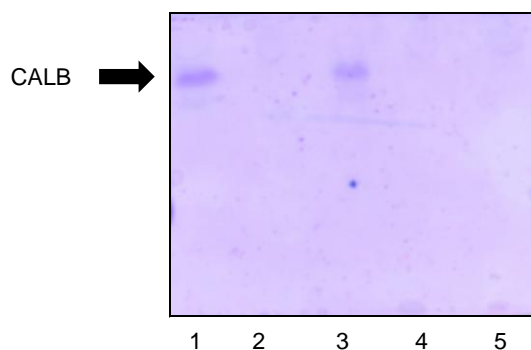
2.5.7 Estudios electroforéticos de los diferentes derivados modificados de CALB. La inmovilización reversible de CALB sobre OC evita probables pérdidas de actividad por las condiciones de reacción de cada modificación química; permite desorber del soporte las moléculas de enzima modificadas utilizando un detergente; y permite la caracterización de las mismas mediante técnicas convencionales.

La **figura 27** muestra la electroforesis nativa de los diferentes derivados modificados de CALB. Se aprecia que solo fue posible visualizar los derivados OC-CALB y OC-CALB-TNBS.

Teniendo en cuenta que en este tipo de electroforesis, las proteínas migran en razón a su relación carga/masa, es posible que la modificación con EDA de los derivados de OC-CALB haya alterado el punto isoelectrico de la enzima por encima del pH del buffer de corrida (pH 8) y por lo tanto no aparezcan en el gel. Este comportamiento era esperado, debido a que la modificación de CALB con EDA incrementa la densidad de cargas positivas sobre la superficie de la enzima,

lo cual a su vez ocasiona un decrecimiento drástico de los grupos aniónicos externos de la lipasa (Fernández-Lafuente y Col., 1998; Rodrigues y Col., 2011)

Figura 27. Electroforesis nativa de los diferentes derivados modificados de CALB. Carril 1: CALB; carril 2: CALB-EDA; carril 3: CALB-TNBS; carril 4: CALB-TNBS-EDA; carril 5: CALB-TNBS-EDA-TNBS.



Los resultados de la electroforesis nativa, fueron confirmados determinando los puntos isoeléctricos (pI) de las 5 preparaciones a través de una electroforesis en 2 dimensiones (**Tabla 4**). Los resultados obtenidos muestran que la modificación de CALB con TNBS (CALB-TNBS) no afectó el punto isoeléctrico de la enzima (pI= 5.8-5.9), mientras que la modificación con EDA (CALB-EDA), ocasionó un cambio notable en el punto isoeléctrico de la CALB (pI>11).

Por su parte, los derivados CALB-TNBS-EDA y CALB-TNBS-EDA-TNBS tienen un punto isoeléctrico mayor que la enzima no modificada. Los resultados obtenidos se deben probablemente a la formación de aminas secundarias con un valor de pKa más bajo que los pKa de las lisinas y de los nuevos grupos amino introducidos (Fernandez-Lafuente y Col., 1998).

Tabla 4. Puntos isoeléctricos de las diferentes preparaciones modificadas de CALB. Los experimentos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección de materiales y métodos.

DERIVADO	PUNTO ISOELÉCTRICO
----------	--------------------

CALB	5.8 - 5.9
CALB-TNBS	5.8 – 5.9
CALB-EDA	>11*
CALB-TNBS-EDA	8.8 – 8.9
CALB-TNBS-EDA-TNBS	8.6 – 8.7

* Los geles utilizados permitían identificar el pI en el intervalo de pH 4-pH 11.

2.5.8 Especificidad y enantioselectividad de los derivados de OC-CALB modificados con EDA y TNBS

2.5.8.1 Efecto de las modificaciones químicas sobre la especificidad de los derivados de OC-CALB en la hidrólisis del mandelato de metilo.

Las modificaciones químicas realizadas sobre el derivado OC-CALB permitieron desarrollar una pequeña librería de biocatalizadores, en algunos casos con una leve hiperactivación frente a un sustrato sintético como el p-NPB y una ligera estabilización bajo ciertas condiciones experimentales. Sin embargo, diferentes estudios encontrados en la literatura (Cabrera y col., 2009; Rodrigues y col., 2011; Galvis y col., 2012) señalan que la modificación química de lipasas es una poderosa herramienta que permite alterar la especificidad de la enzima. Por esta razón, se evaluó la actividad de los derivados modificados de OC-CALB en la hidrólisis del R-mandelato de metilo, sustrato de estructura química más compleja en comparación con el p-NPB.

La **tabla 5** muestra el comportamiento de los diferentes derivados de OC-CALB en la hidrólisis del R-mandelato de metilo a valores de pH 5, 7 y 9.

Tabla 5. Actividad de las diferentes preparaciones de OC-CALB en la hidrólisis del R-Mandelato de metilo, 10 mM a pH 7 y 25°C. Los experimentos fueron realizados de acuerdo a lo descrito en la sección métodos experimentales, numeral 3.6.

Biocatalizador	Actividad Enzimática ^a		
	pH 5	pH 7	pH 9
OC-CALB	44.8 ± 1	48.4 ± 1	11.6 ± 0.5
OC-CALB-EDA	22.6 ± 0.5	30.6 ± 1.5	9.1 ± 0.5
OC-CALB-TNBS	71.3 ± 1	33.3 ± 1	10.9 ± 0.5
OC-CALB-TNBS-EDA	25.2 ± 1	29.8 ± 1	11.2 ± 0.5
OC-CALB-TNBS-EDA-TNBS	25.8 ± 0.5	27.5 ± 0.5	11 ± 0.5

^a La Actividad se definió como $\mu\text{mol/g}_{\text{biocatalizador}}/\text{min}$ usando como sustrato R-mandelato de metilo (10mM).

En la **tabla 5**, sobresale el derivado OC-CALB por ser el más activo a pH 7 (48U/g) en comparación con los derivados modificados de OC-CALB. Sin embargo, el cambio en el valor de pH del medio de reacción ocasionó una disminución en la actividad de este derivado. A pH 5, su actividad disminuyó levemente en un factor de 1.1, mientras que a pH 9 decreció 4 veces con respecto a la actividad a pH 7.

El comportamiento del derivado OC-CALB, fue totalmente diferente cuando se empleó como sustrato el p-NPB (ver **figura 25**), en donde exhibió su máxima actividad a pH 9. Este cambio en el perfil pH/Actividad de la enzima, es consecuencia de la naturaleza química del sustrato. Mientras el p-NPB es un sustrato neutro, el R-mandelato de metilo tiene un grupo ionizable. Por tanto, la conformación “óptima” que adopte la enzima a un valor de pH dado, será diferente cuando se use p-NPB o se emplee como sustrato el R-mandelato de metilo. Esto se verá reflejado en un cambio evidente en la especificidad de la enzima hacia uno u otro sustrato (Barbosa y col., 2012).

Por ejemplo, el derivado OC-CALB-EDA es menos activo frente al R-mandelato de metilo a los 3 valores de pH estudiados, en comparación con la enzima no modificada. Estos resultados contrastan con la alta actividad exhibida por este derivado frente al p-NPB, principalmente a valores de pH ácidos.

El derivado OC-CALB-TNBS que no mostró cambios drásticos en su actividad frente al p-NPB a los valores de pH estudiados, incrementó su actividad a pH 5 en un 160% cuando se empleó como sustrato el R-mandelato de metilo. A pH 7 disminuyó su actividad 1.45 veces, mientras que a pH 9 la actividad no sufrió ningún cambio significativo.

La aminación del derivado OC-CALB-TNBS produjo un decrecimiento significativo de la actividad frente al R-mandelato de metilo a pH 5 (alrededor de un factor de 3) con respecto a este mismo derivado no aminado. A pH 7, sufrió una leve disminución de la actividad, mientras que a pH 9, el efecto de la modificación con EDA fue despreciable. Además, esta preparación fue menos activa que el derivado de CALB sin modificar excepto a pH 9. La alteración adicional con TNBS (OC-CALB-TNBS-EDA-TNBS) no causó un efecto significativo sobre la actividad enzimática frente a este sustrato.

Por lo tanto, los resultados obtenidos mostraron que diferentes derivados modificados de la misma lipasa presentan distinta actividad frente a un mismo sustrato; y, un mismo derivado presenta diferente actividad frente a distintos sustratos. Además, el efecto del pH sobre la actividad catalítica de las lipasas también es diferente dependiendo del derivado inmovilizado utilizado.

2.5.8.2 Enantioselectividad de los diferentes derivados de CAL-B catalizando la hidrólisis de R y S-mandelato de metilo. La propiedad catalítica más interesante de las lipasas es la enantioselectividad (E) frente a sustratos quirales. En este caso, se analizó el efecto de la modificación química sobre la

enantioselectividad de los derivados de CALB en la hidrólisis del R y S mandelato de metilo bajo diferentes condiciones de reacción.

Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación (Escorcia y col., 2011), han confirmado que esta reacción sigue una cinética de primer orden (hasta una concentración máxima del éster de 100 mM). Por lo tanto, la enantioselectividad (E) de los diferentes derivados modificados de CALB puede ser determinada como la razón entre la velocidad de reacción del enantiómero R con la velocidad del enantiómero S.

Bajo las condiciones de estudio a pH 5, 7 y 9 a 25°C (**Tabla 6**), todos los derivados modificados de la CALB presentaron una preferencia estereoquímica sobre el enantiómero R.

Los valores de E para cada derivado (**tabla 6**) variaron en muchos casos de forma drámica, con el cambio de pH del medio de reacción. Por ejemplo, el derivado OC-CALB exhibió su valor máximo de enantioselectividad a pH 7 (E=25.5); a pH 9, el valor E disminuyó en un factor de 2.9 veces (E= 8.9) y a pH 5 decreció aproximadamente 2.2 veces (E=11.2).

La aminación produjo un incremento en la enantioselectividad del derivado OC-CALB-EDA a pH 7 (E=35.6) y a pH 9 (E=11.4) con respecto al derivado no modificado OC-CALB. Sin embargo, a pH 5 el valor E disminuyó en un factor de 1.5 veces (E=7.3). En este punto, es importante resaltar, el valor E de 35.6 del derivado a pH 7, constituyendo la preparación más enantioselectiva encontrada en este estudio. El resultado sugiere que la modificación con EDA causó una disminución en la actividad del derivado OC-CALB-EDA frente al enantiómero S a pH 5.

La modificación química con TNBS produjo un aumento en la enantioselectividad del derivado OC-CALB-TNBS a pH 5 de 1.4 veces (E=16.2) y a pH 9 de 1.7 veces

(E=15.2) con respecto al derivado no modificado. Por su parte, a pH 7 (E=22), no se registró alteración en el valor de E en comparación con el derivado OC-CALB.

La aminación adicional del derivado OC-CALB-TNBS, ocasionó que el derivado OC-CALB-TNBS-EDA fuera 7.6 veces menos enantioselectivo a pH 5, que el derivado OC-CALB. A pH 9, la preparación modificada fue 1.4 veces más enantioselectiva que la CALB. Sin embargo, a pH 7, la modificación química no afectó el valor de E del derivado modificado.

Por su parte, el derivado OC-CALB-TNBS-EDA-TNBS exhibió una enantioselectividad similar a su derivado precursor (OC-CALB-TNBS-EDA) en los 3 valores de pH estudiados. Este comportamiento es interesante si se considera el cambio drástico que sufre la naturaleza química de la superficie enzimática como consecuencia del aumento de la hidrofobicidad.

Por lo tanto, las modificaciones químicas realizadas sobre la superficie de CALB, produjeron importantes cambios en la enantioselectividad de la enzima bajo diferentes condiciones experimentales. En este sentido, es de resaltar los valores aceptables de enantioselectividad que exhibieron los derivados OC-CALB-TNBS a pH 5 (E=16.2) y a pH 9 (E=15.2), y de OC-CALB-EDA a pH 7 (E=35.6).

Tabla 6. Enantioselectividad de los derivados modificados de CALB en la hidrólisis del R y S-mandelato de metilo 10 mM, bajo diferentes condiciones experimentales. Los experimentos fueron realizados de acuerdo a lo descrito en la sección de materiales y métodos

Biocatalizador	pH 5		pH 7		pH 9	
	Enantio-preferencia	E ^a	Enantio-preferencia	E ^a	Enantio-preferencia	E ^a
OC-CALB	R	11.2±0.15	R	25.5 ± 0.2	R	8.9 ± 0.1

OC-CAL-EDA	R	7.3 ± 0.1	R	35.6 ± 0.2	R	11.4 ± 0.1
OC-CALB-TNBS	R	16.2 ± 0.2	R	22.2 ± 0.2	R	15.2 ± 0.1
OC-CALB-TNBS-EDA	R	7.6 ± 0.1	R	27 ± 0.25	R	12.4 ± 0.1
OC-CALB-TNBS-EDA-TNBS	R	6.1 ± 0.1	R	27.5±0.15	R	12.2 ± 0.1

^a El valor E se determinó como la razón: Actividad frente a R-mandelato de metilo / Actividad frente a S-metil mandelato.

2.6 CONCLUSIONES

A modo de resumen del presente capítulo se presentan las siguientes conclusiones:

- El efecto final de la modificación de la superficie enzimática de la CALB con EDA y TNBS es significativamente dependiente del protocolo de inmovilización utilizado y de la región proteica de la enzima involucrada en la inmovilización. Los derivados de CALB inmovilizados por adsorción interfacial sobre Octil-agarosa (OC-CALB), y modificados posteriormente con EDA y TNBS fueron más activos frente al pNPB que los derivados BrCN-CALB modificados en las mismas condiciones experimentales. Por ejemplo, la modificación con EDA del derivado OC-CALB produjo un incremento en la actividad frente al p-NPB de 40%, mientras que la aminación de BrCN-CALB ocasionó una disminución de 51%.
- Las propiedades biocatalíticas exhibidas por los derivados de OC-CALB modificados con EDA y TNBS son diferentes dependiendo del agente

modificante empleado. Así, la aminación de OC-CALB produjo un incremento de 40% en la actividad frente al pNPB, mientras que el tratamiento de OC-CALB con TNBS ocasionó una disminución en la actividad pNPB del 17%, en comparación con el derivado no modificado.

- La modificación química del derivado BrCN-CALB con EDA y con TNBS produjo una disminución dramática en la actividad enzimática frente al p-NPB, siendo más significativo el efecto adverso cuando se usó EDA (la actividad decreció alrededor del 50%) que cuando se utilizó TNBS (la actividad disminuyó 40%).
- Las modificaciones químicas con EDA y TNBS del derivado OC-CALB, ocasionaron cambios en la estabilidad térmica de la enzima a diferentes valores de pH. Por ejemplo, a pH 5, la aminación generó un incremento en la estabilidad del derivado OC-CALB-EDA, mientras que a pH 9, el efecto positivo en la estabilidad lo generó la modificación con TNBS.
- Las modificaciones químicas secuenciales del derivado OC-CALB con EDA y TNBS permitieron obtener biocatalizadores con diferente especificidad en la hidrólisis de R-mandelato de metilo, a valores de pH 5, 7 y 9. Sobresalen las actividades mostradas por el derivado OC-CAL-TNBS a pH 5 (71.3 u/g_{biocat}), pH 7 (33.3 U/g_{biocat}) y por OC-CALB-TNBS-EDA a pH 9 (11.2 U/g_{biocat}).
- Las modificaciones químicas realizadas sobre la superficie de CALB, produjeron importantes cambios en la enantioselectividad de los derivados modificados de OC-CALB en la hidrólisis del R y S-mandelato de metilo bajo diferentes valores de pH. Es de resaltar la enantioselectividad que exhibieron los derivados OA-CALB-TNBS a pH 5 (E=16.2) y a pH 9 (E=15.2) y OC-CALB-EDA a pH 7 (E=35.6).

- La introducción de grupos amino y grupos hidrofóbicos trinitro-bencil sobre la superficie proteica de CALB permitió alterar las propiedades biocatalíticas de la lipasa. Además, la modificación de CALB en fase sólida con EDA y TNBS es una poderosa herramienta para alterar las propiedades biocatalíticas de la enzima.

3. MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOCATALÍTICAS DE CALB MEDIANTE MODIFICACIÓN DE LA DENSIDAD DE CARGA SUPERFICIAL

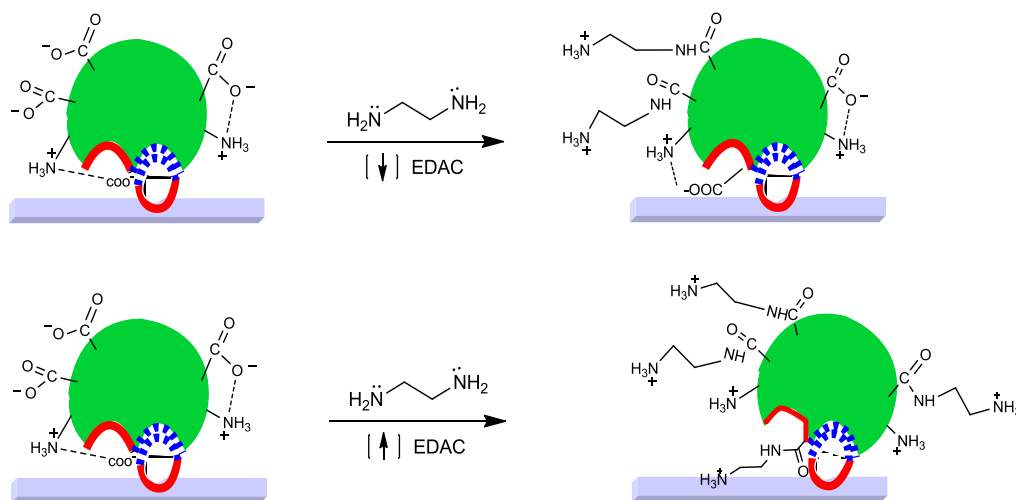
3.1 INTRODUCCIÓN

De acuerdo con lo descrito en el capítulo 1, la aminación de la superficie enzimática con etilendiamina (EDA) es una modificación que permite alterar las propiedades biocatalíticas de las enzimas: actividad, enantioselectividad y estabilidad, al propiciar la formación de un mayor número de enlaces covalentes intramoleculares e intermoleculares entre los grupos amino introducidos en la enzima con diferentes grupos electrofílicos (Galvis y col., 2012; Ruiz y Col., 2012).

Para el caso de las lipasas, es posible que la aminación transforme interacciones negativas en positivas, ayudando a estabilizar la forma abierta o cerrada de la lipasa, o modificando la forma exacta del centro activo al alterar las interacciones que lo determinan. Los resultados previamente obtenidos, muestran que la modificación del 100 % de los grupos carboxilo expuestos en la superficie de la CALB ocasionó un efecto sobre la actividad, estabilidad y especificidad de la enzima a diferentes valores de pH. Por lo tanto, se propuso evaluar el efecto ocasionado por la modificación parcial de los residuos de ácido aspártico y glutámico de la CALB con EDA sobre las propiedades biocatalíticas de la lipasa.

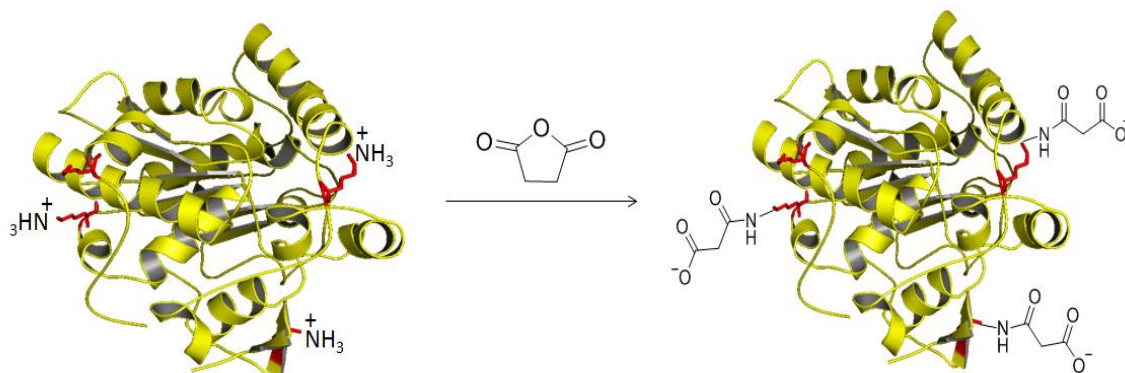
Las modificaciones parciales (10% y 50%) de los residuos de ácido aspártico y ácido glutámico de CALB con EDA, pueden generar la aparición de nuevas interacciones electrostáticas en la forma abierta o la forma cerrada, producto de la alteración en el balance de cargas sobre la superficie enzimática y el cambio global en el microambiente que rodea la enzima (**Figura 28**).

Figura 28. Aminación de grupos carboxilos previamente activados con carbodiimida de la CALB inmovilizada sobre octil-agarosa.



La densidad de carga superficial de CALB también puede ser alterada a través de la acilación de los grupos amino de lisinas con anhídrido succínico. De forma tal, que la modificación permite obtener derivados estables con mayor densidad de carga negativa (**figura 29**) a valores de pH donde los grupos carboxilo están desprotonados (pH mayor a 5). Además, puede llegar a alterar la solubilidad de la proteína al generar interacciones intermoleculares adicionales. Por lo tanto, es posible que la modificación de CALB parcial y totalmente con anhídrido succínico ocasione cambios estructurales en la conformación 3D de la enzima y en consecuencia una alteración de las propiedades biocatalíticas de la lipasa. El control del grado de modificación se puede realizar a través de la cantidad de anhídrido succínico sólido adicionado a la reacción (Cabrera y col., 2009).

Figura 29. Succinilación química de la superficie enzimática de la CALB.



3.2 MATERIALES

La lipasa B de *Candida antarctica* (CAL-B) fue obtenida de Novozymes. El Octil agarosa 4BCL, Tritón X-100, p-nitrofenilbutirato (p-NPB), el ácido picril sulfónico (TNBS), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbo-di-imida (EDAC), (R/S)-mandelato de metilo, (R/S)-Propanolol-HCl, (R/S)-Atenolol-HCl y cada uno de los isómeros puros fueron obtenidos de Sigma Aldrich (St. Louis, Mo, USA). El soporte de Eupergit C fue donado por Rohm Pharma (Darstamdt, Alemania). Los marcadores de peso molecular de proteínas para electroforesis de proteínas 1D se obtuvieron de Fermentas. Los reactivos utilizados en la síntesis y en las reacciones fueron todos de grado analítico y suministrado por Sigma Aldrich y Merck.

3.3 MÉTODOS EXPERIMENTALES

La CALB fue inicialmente inmovilizada y purificada sobre Octil-agarosa a baja fuerza iónica. Posteriormente, se realizaron modificaciones parciales sobre la superficie enzimática del derivado CALB, utilizando etilendiamina y anhídrido

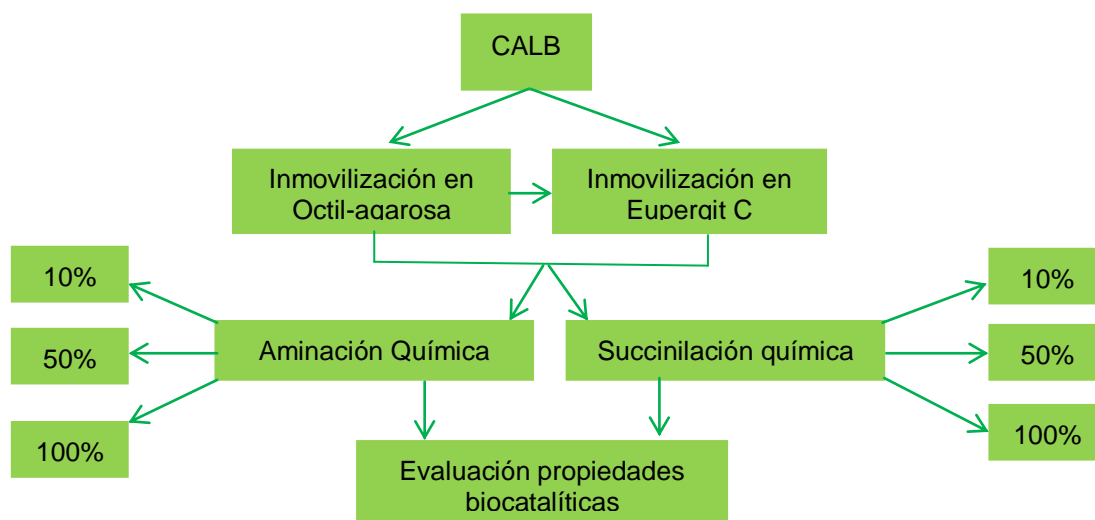
succínico. Se estandarizaron las condiciones experimentales para modificar el 10%, 50% y el 100% de los grupos carboxílicos y los grupos amino expuestos.

Una vez obtenidas las diferentes preparaciones de CALB aminadas y succiniladas, se evaluaron las propiedades biocatalíticas de las lipasas modificadas bajo diferentes condiciones experimentales.

Finalmente, las condiciones de modificación estandarizadas con el derivado OC-CALB fueron estudiados en el derivado de CALB inmovilizada covalentemente sobre el soporte Eupergit C (EC-CALB).

La **figura 29**, muestra la metodología general propuesta para el logro de los objetivos.

Figura 29. Metodología general propuesta para el estudio de la modificación parcial y total de la CALB con etilendiamina.



3.3.1 Inmovilización de la CALB sobre diferentes soportes

3.3.1.1 Inmovilización de CALB por adsorción hidrofóbica sobre Octil-agarosa (OC). La CALB fue inmovilizada a baja fuerza iónica de acuerdo con lo propuesto por Bastidas y col., 1998. Un ml del extracto comercial de CALB, con una concentración de proteína de 5.9 mg/ml y una actividad específica de 4.9 U/mg, fue diluido en 99 ml de buffer fosfato de Sodio 5 mM de pH 7. A continuación, se adicionaron 10 g de soporte Octil-agarosa. Periódicamente, se evaluó el proceso de inmovilización de la CALB sobre el soporte, midiendo la actividad residual de la suspensión y el sobrenadante en la hidrólisis del p-NPB (Ver posteriormente numeral 4.1). Después de 3 horas a 4 °C, bajo agitación constante a 250 rpm, la suspensión de inmovilización fue filtrada y la lipasa inmovilizada fue lavada 3 veces con agua destilada y buffer fosfato de sodio 25 mM de pH 7. El derivado fue llamado OC-CALB.

3.3.1.2 Inmovilización covalente de CALB en el soporte Eupergit C. Para la inmovilización de CALB en el soporte Eupergit C, la lipasa fue previamente purificada mediante cromatografía de adsorción interfacial a baja fuerza iónica sobre Octil-agarosa (ver numeral 3.1.1) y desorbida del soporte con tritón x-100 como se describe a continuación:

3.3.1.2.1. Purificación de la CALB. 2 ml del extracto comercial de la CALB (concentración de proteína de 5.9 mg/ml) fueron diluidos en 98 ml de buffer fosfato de Sodio 5 mM de pH 7 (relación 1/50) y adicionados a 10 gramos de Octil-agarosa. Transcurridas 3 horas del proceso, la enzima adsorbida fue filtrada y lavada con agua destilada. A continuación, la CALB adsorbida en Octil-agarosa fue resuspendida en 100 mL de buffer fosfato de sodio (5 mM) de pH 7, que contenía tritón X-100 al 1% (v/v). Este tratamiento permitió desorber la enzima purificada del soporte (Bastida y col., 1998; Fernández-Lorente y col., 2008).

3.3.1.2.2 Inmovilización de CALB en Eupergit C. Un gramo del soporte Eupergit C, fue suspendido en 10 mL de solución enzimática previamente purificada que contenía buffer fosfato de sodio 1M de pH 7 y tritón X-100 al 0.1% (v/v). Periódicamente, se evaluó el transcurso de inmovilización de la CALB sobre el soporte, midiendo la actividad residual de la suspensión y el sobrenadante en la hidrólisis del p-NPB (Ver numeral 4.1). Una vez finalizada la inmovilización, la suspensión fue filtrada y lavada 3 veces con buffer fosfato de sodio 25 mM de pH 7.

Finalmente, el derivado de CALB obtenido fue incubado en 5 mL de una solución de fosfato de sodio 50 mM que contenía glicina-HCl 1M a pH 8.5, con el fin de bloquear los grupos epóxido que no participaron en la inmovilización. Después de 24 horas de incubación el derivado fue lavado con agua destilada y buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7, y almacenados a 4 °C. El derivado fue llamado EC-CALB.

3.3.2 Modificación química en fase sólida de la superficie enzimática de CALB

3.3.2.1 Aminación de los derivados de CALB inmovilizados en Octil-agarosa (OC-CALB) y en Eupergit C (EC-CALB). Un gramo de derivado OC-CALB fue incubado en 10 mL de una solución de etilendiamina (EDA) 1M a pH 4.75 bajo agitación continua. La reacción de modificación de la superficie del derivado de CALB se inició con la adición de diferentes concentraciones de carbo-di-imida (EDAC), es decir, 3, 10 y 100 mM para obtener modificaciones de 10, 50 y 100 %, respectivamente. Después de 90 minutos de agitación a temperatura ambiente, los derivados aminados de la CALB se lavaron con buffer fosfato 25mM, pH 7 y un exceso de agua destilada. Posteriormente, se filtraron al vacío y se almacenaron a 4 °C (Carraway y Koshland, 1966; Rodrigues y col., 2009). Los derivados obtenidos por este procedimiento se denominaron OC-CALB-EDA-10%, OC-CALB-EDA-50% y OC-CALB-EDA-100%.

Los derivados OC-CALB-EDA-10%, OC-CALB-EDA-50% y OC-CALB-EDA-100% fueron incubados en hidroxilamina-HCl 1M a pH 7 durante aproximadamente una hora a 25°C para recuperar los residuos hidroxilo de las tirosinas que hubieran resultado afectados por el proceso de modificación química (Carraway y Koshland, 1968; Geoghegan, 2001; Hermanson, 2008).

El procedimiento anterior fue utilizado de forma similar en los derivados de CALB inmovilizados covalentemente sobre el soporte Eupergit C (EC-CALB).

3.3.2.2 Carboxilación de grupos amino de los derivados de CALB inmovilizados en Octil-agarosa (OC-CALB) y en Eupergit C (EC-CALB) con anhídrido succínico. Un gramo de derivado CALB inmovilizada en Octil-agarosa se incubó en 10 mL de buffer fosfato 10 mM de pH 8 bajo agitación magnética continua a temperatura ambiente. La reacción de modificación se inició con la adición de anhídrido succínico en diferentes concentraciones: 1, 20 y 100 mM, para obtener modificaciones de 10, 50 y 100 %, respectivamente. Después de 120 minutos de agitación, los derivados de la CALB succinilada (CALB-S), se lavaron con buffer fosfato pH 7 y un exceso de agua destilada. Posteriormente, se filtraron al vacío, y se almacenaron a 4 °C (Alcalde y col., 2001; Cabrera y col., 2009). Los derivados obtenidos se llamaron OC-CALB-S-10%, OC-CALB-S-50% y OC-CALB-S-100%.

Las condiciones de modificación anteriormente descritas fueron aplicadas en el derivado de CALB inmovilizado en Eupergit C.

3.3.3 Evaluación de la estabilidad de los derivados aminados y succinilados de OC-CALB. La estabilidad de los derivados de OC-CALB aminados y succinilados parcial y totalmente fue evaluada bajo diferentes condiciones experimentales.

3.3.3.1 Estabilidad térmica. La termo-estabilidad de los derivados OC-CALB aminados y succinilados al 10, 50 y 100 % se determinó por triplicado a 70°C tal como se describe a continuación:

500 mg del respectivo derivado de OC-CALB fueron incubados en 5 ml de buffer fosfato 25 mM de pH 7. Periódicamente, se extrajeron 100 µL de suspensión y se determinó la actividad residual usando como sustrato p-NPB (Ver numeral 4.1)

3.3.3.2 Estabilidad frente a Tetrahidrofurano. Los derivados aminados de OC-CALB fueron incubados en una mezcla al 50% de tetrahidrofurano (THF)/ buffer Tris-HCl 50 mM a pH 7 a 40 °C. Periódicamente, se extrajeron 100 µL de suspensión para evaluar la actividad enzimática residual frente al sustrato p-NPB tal como se describe en el numeral 4.1.

3.3.4 Estudio del efecto de la aminación química en los derivados OC-CALB y EC-CALB frente a la actividad hidrolítica del pNPB. La actividad hidrolítica de los derivados OC-CALB y EC-CALB aminados al 10%, 50% y 100 %, fue determinada por el método descrito en el numeral 4.1.

3.3.5 Evaluación de la especificidad y enantioselectividad de los derivados modificados de CALB. La especificidad y enantioselectividad de los derivados modificados de la CALB fue evaluada en la reacción de hidrólisis de (R) y (S)-mandelato de metilo y en las transesterificaciones de los aminoalcoholes (R/S)-propanolol y (R/S)-atenolol.

3.3.6 Estudio del efecto de la modificación química de los derivados EC-CALB y OC-CALB, sobre la hidrólisis enantioselectiva del (R/S) mandelato de metilo. La actividad enzimática y enantioespecificidad de los diferentes derivados de CALB fue evaluada en la hidrólisis en medio acuoso del mandelato de metilo, de forma similar a lo descrito en el capítulo 1, sección 3.5 de la tesis doctoral.

3.3.7 Estudio del efecto de la modificación química de los derivados EC-CALB, sobre la trans-esterificación enantioselectiva de (R/S)-propanolol y (R/S)-atenolol. Una vez obtenidos los diferentes derivados de EC-CALB aminados, se evaluó la enantioselectividad expresada por estos biocatalizadores en la resolución cinética de los amino-alcoholes mediante reacciones de transesterificación de los sustratos quirales propanolol y atenolol (curvas de calibración anexo 2). Se evaluó la enantioselectividad de los derivados de EC-CALB aminados en las reacciones de trans-esterificación de los sustratos quirales propanolol y atenolol (curvas de calibración anexo 2). Se utilizó acetato de vinilo como donador acilo y tolueno como solvente orgánico.

Inicialmente, se preparó una solución de (R/S)-propanolol (o atenolol) 200 mM en metanol para facilitar la dilución de los mismos. A continuación, para las reacciones de transesterificación del propanolol se llevó a cabo la siguiente mezcla de reacción: 0.1 mmol (25.93 mg) de (R/S)-propanolol, 0.3 mmol (27.71 μ L) de acetato de vinilo, tolueno hasta completar un volumen final de 3 mL y derivado enzimático a razón de: 50 mg soporte EC-CALB, EC-CALB-EDA, EC-CALB-S.

Finalmente, para las reacciones de transesterificación del atenolol (Barbosa et al., 2011), se fijó un volumen de reacción en 3 mL conformados por: 0.05 mmol (13.3 mg) de (R/S)-atenolol, 0.1 mmol (9.23 μ L) de acetato de vinilo, tolueno hasta completar el volumen final y derivado enzimático a razón de: 50 mg soporte EC-CALB, EC-CALB-EDA y EC-CALB-S.

Los productos de la reacción fueron determinados por HPLC en fase reversa, usando un equipo HPLC (Agilent 1100) con una columna Zorbax C-18 (5 μ m, 250 x 4.6 mm). La fase móvil consistió de una mezcla isocrática de acetonitrilo-buffer fosfato 25 mM de pH 6, en una proporción volumétrica 70:30 (v/v). Los compuestos se determinaron utilizando un detector con arreglo de diodos UV a 289 nm y un flujo de 1 mL/min, con un volumen de 5 μ L de inyección y tiempos de

retención de 2.8 min R-propanol, 3.0 min S-propanol, 3.4 min R butiril propanol, 2,8 min R-atenolol, 2.9 min S-atenolol, 3.3 min R-O-acetil atenolol y 6.4 min para el tolueno.

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.4.1 Determinación estándar de la actividad enzimática frente al p-nitrofenil-butirato (p-NPB). La actividad catalítica de CALB se cuantificó de forma continua a través del método de velocidades iniciales de reacción. El ensayo se llevó a cabo midiendo el aumento en el valor de absorbancia a 348 nm, producido por la formación del producto p-nitrofenol (coeficiente de extinción molar= $5150 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) generado por la hidrólisis de p-NPB 0.4 mM, disuelto en tampón fosfato sódico 25 mM, pH 7 a 25 °C. Para iniciar la reacción, 100 μL de solución lipásica se añadieron a 2.5 mL del sustrato. Una unidad internacional de actividad enzimática fue definida como la cantidad de lipasa que es necesaria para hidrolizar $1 \mu\text{mol}$ de p-NPB por minuto (IU) bajo las condiciones descritas anteriormente.

3.4.2 Determinación del grado de modificación de los grupos amino y carboxilo de CALB. Los grados de modificación de los grupos amino y carboxilo de CALB fueron determinados mediante la titulación de los grupos aminos primarios usando la metodología del ácido picril sulfónico (Snyder y col., 1975; Montes y col., 2006;). A 350 mg derivado enzimático de CALB modificado, se adicionaron 3 mL de solución de ácido picril sulfónico o TNBS 0.1% (p/v) a pH 8. Después de 30 minutos de reacción a temperatura ambiente, el derivado se lavó con agua destilada. 200 mg se resuspendieron en 2.1 mL de borato de sodio 1M pH 9 y la medición de absorbancia se llevó a cabo a 430nm. Se usó como blanco de reacción octil-agarosa libre de enzima.

3.4.3 Estudios electroforéticos de los derivados modificados de CALB

3.4.3.1 Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). En la electroforesis en condiciones desnaturizantes o SDS-PAGE (Laemmli 1970), se utilizó el buffer de ruptura (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanol, 5% glicerol) y geles de poliacrilamida al 12%(p/v) en la zona de separación y de 5% (p/v) en la zona de concentración. A 10 mg de derivado enzimático se le adicionaron 30 μ L de buffer de ruptura y se calentaron en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos. Posteriormente, fueron mantenidas en baño de hielo durante 5 minutos. Finalmente, se adicionaron 20 μ L de muestra. La electroforesis se llevó a cabo en un equipo PowerPac HC (BIORAD), a temperatura ambiente y a un voltaje de 150V durante 1 hora.

3.4.3.2 Electroforesis en condiciones no desnaturizantes (nativa-PAGE). Para la electroforesis en condiciones no desnaturizantes o nativa-PAGE (Laemmli, 1970 modificado), 50 mg de derivado enzimático fueron re-suspendidos en 0.5 mL de una solución de Tritón al 1% (v/v) en buffer fosfato 25mM pH 7 por 24 h a 4 °C. Al sobrenadante se le adicionó buffer de corrida sin SDS ni mercaptoetanol. Finalmente, se adicionaron 20 μ L de muestra en geles de concentración 5%(p/v) y de separación 12%(p/v) de poliacrilamida sin SDS, a temperatura ambiente y a un voltaje 150V durante 4h en un equipo PowerPAC HC (BIORAD). El revelado de las proteínas se realizó mediante tinción con azul brillante de Coomassie R-250 y usando marcadores de peso molecular (200-7 kDa). Los geles obtenidos fueron posteriormente escaneados con un densitómetro UMAX PowerLook 2100XL y visualizados a través del software PDQuest (Biorad).

3.4.4 Determinación del exceso enantiomérico (ee_s y ee_p) y de la enantioselectividad (E) de una reacción reversible. Los excesos enantiomérico (ee_s) del S-Propanolol, del S-Atenolol y del éster formado (ee_p) se analizaron por HPLC quiral (curvas de calibración en anexo 5), cuando la reacción enzimática

alcanzó una conversión de 20 – 30%. Los productos de reacción se determinaron usando una columna quiral (ES-OVM, Agilent technologies, USA). Para su separación se utilizó como fase móvil una mezcla isocrática de metanol/buffer fosfato pH 6 (30:70 v/v) a un flujo de 1 ml/min utilizando un equipo de HPLC (Agilent 1100). La relación enantiomérica se calculó usando un estándar interno y la ecuación reportada por Chen y col., 1982.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1 Inmovilización de CALB por adsorción hidrofóbica sobre octil-agarosa.

La CALB fue inmovilizada por adsorción interfacial a baja fuerza iónica, de acuerdo con lo propuesto por Bastida y Col., 1998. Los resultados obtenidos señalan que al cabo de 60 minutos de incubación de la suspensión enzimática, se logró una inmovilización del 95 % de la CALB, con una carga enzimática de 1mg de proteína/g soporte. Los resultados son similares a los descritos en el capítulo 1, mostrando la alta reproducibilidad del proceso de inmovilización. El derivado fue nombrado como OC-CALB.

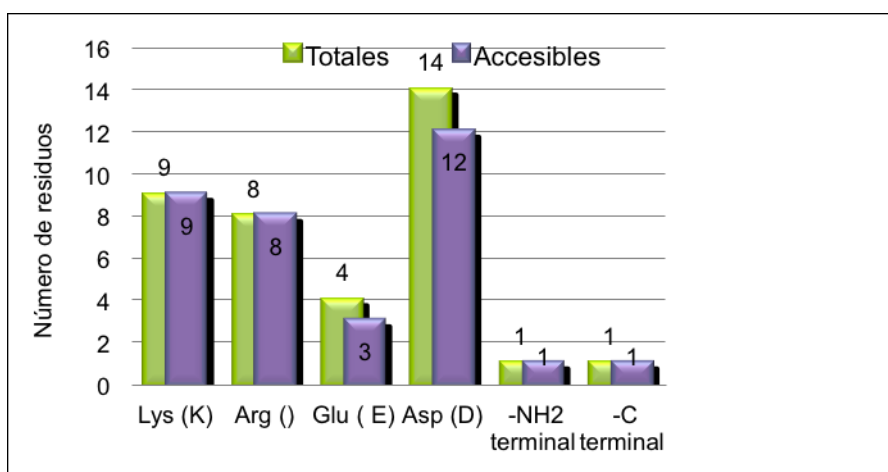
3.5.2 Modificación química en fase sólida de la superficie enzimática de CALB.

Para el estudio, evaluación y caracterización de la modificación química de la CALB, con etilendiamina y anhídrido succínico se utilizó la enzima inmovilizada de manera reversible sobre el soporte octil-agarosa (OC-CALB). Dicho soporte permite fijar la forma abierta de la lipasa. Además, este soporte posee una transparencia óptica que permite la determinación de los diferentes grados de modificación a través de métodos sencillos como por ejemplo métodos espectrofotométricos (Harvey y Manning, 1950). La **figura 30**, muestra la distribución de grupos ionizables más abundantes en la superficie enzimática (lisinas, argininas, ácidos aspártico y glutámico) de la lipasa B de la *Candida*

antarctica, susceptibles a ser modificados químicamente con etilendiamina y anhídrido succínico.

La accesibilidad del agente modificante a los residuos aminoacídicos de CALB, fueron calculados por la base de datos program ASA-view (<http://www.netasa.org/asaview/>). El programa divide la accesibilidad de cada residuo frente a la presencia de un solvente y lo divide en tres grados: muy expuestos, moderadamente expuestos y no expuestos a los solventes.

Figura 30. Número de residuos ionizables susceptibles a ser modificados en la CALB. En verde, el número total de residuos ionizables, en morado el número de residuos expuestos al medio con respecto al total de cada grupo.



De la **figura 30**, se concluye que la CALB cuenta con 19 residuos carboxílicos distribuidos en 14 ácidos aspárticos, 4 ácidos glutámicos y 1 grupo carboxilo-terminal, los cuales se encuentran accesibles a la modificación parcial y total con etilendiamina. Adicionalmente, la CALB posee 9 grupos amino primario de los residuos de lisinas, 8 más de las argininas y el grupo amino-terminal, susceptibles a la modificación química con anhídrido succínico.

Por lo tanto, teniendo en cuenta el número de residuos ionizables sobre la superficie enzimática de la CALB susceptibles a modificación con etilendiamina y anhídrido succínico es posible que la modificación parcial y total de los mismos ocasionen una alteración en el número de fuerzas intermoleculares implicadas en el mantenimiento de la estructura de las diferentes conformaciones. Una modificación en el mecanismo de apertura y cierre de la lipasa, podría dar lugar a cambios estructurales en la forma exacta del centro activo de la enzima, viéndose esto reflejado en la expresión de sus propiedades biocatalíticas de actividad, especificidad, selectividad y estabilidad (Davis, 2003; Rodrigues y Col., 2011; Díaz-Rodríguez y col., 2011; Galvis y Col., 2012).

3.5.2.1 Modificación química de los grupos amino del derivado OC-CALB con anhídrido succínico. La introducción de grupos carboxilo en la superficie proteica mediante reacción de los grupos ϵ -amino de las lisinas con anhídrido succínico genera un aumento en la densidad de cargas negativas cuando los nuevos grupos introducidos son desprotonados al ser sometidos a valores de pH por encima del pKa (Cabrera y col., 2009; Rodrigues y col., 2011).

La lipasa CALB presenta nueve lisinas con grupos ϵ -amino primarios, además del grupo amino terminal (Uppenberg y col., 1994; Lutz, 2004). Todos estos grupos son susceptibles a la modificación por succinilación y completamente accesibles a la solución.

3.5.2.1.1 Control del grado de succinilación química. El control del grado de modificación de los grupos amino se realizó regulando la concentración molar de anhídrido succínico en el medio de reacción. Previamente, Cabrera y Col., (2009) estandarizaron la concentración máxima de anhídrido succínico (100 mM) necesaria para modificar el 100 % de los residuos de Lys de la lipasa Novozym-435.

Como se puede apreciar en la **tabla 7**, se han obtenido distintos grados de modificación variando únicamente el exceso molar de reactivo. Así por ejemplo, para lograr una modificación del 10% de los grupos amino presentes en la superficie enzimática de la CALB, bastó una concentración de 1 mM de anhídrido succínico en el medio de reacción. Por su parte, una modificación de aproximadamente el 50% de los residuos de lisina es posible utilizando una concentración de anhídrido succínico 20 mM.

El grado de modificación se determinó mediante la reacción del ácido picrilsulfónico (TNBS) con los grupos amino primarios disponibles después de la succinilación del derivado de la CALB. El TNBS se une a los grupos amino primarios de la proteína formando derivados altamente cromogénicos de color amarillo que pueden ser cuantificados por medio de medidas espectrofotométricas (Hermanson, 2008). Los ensayos se realizaron según lo descrito en la en la sección 4.2.

Tabla 7. Grado de modificación de los grupos amino de las lisinas de CALB inmovilizada sobre octil agarosa y después succinilada. Las condiciones de modificación fueron descritas en la sección de métodos experimentales, numeral 3.2.2.

Anhídrido succínico (mM)	Grado de modificación (%)	Referencia
1	10	ND*
20	40-50	ND*
100	100	Cabrera y col., 2009

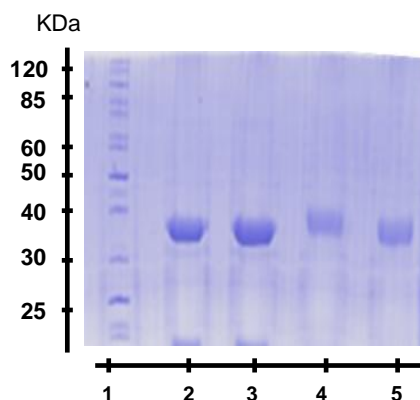
ND* no determinada en estudios publicados anteriormente.

Los derivados de OC-CALB modificados bajo las condiciones descritas en la tabla 7, se nombraron de acuerdo con el grado de modificación así: OC-CALB-S-10%; OC-CALB-S-50% y OC-CALB-S-100%.

3.5.2.1.2 Caracterización electroforética de los derivados de OC-CALB succinilados. La caracterización electroforética de los derivados de CALB inmovilizados en octil agarosa y modificados por succinilación al 10% (OC-CALB-S-10%), 50% (OC-CALB-S-50%) y 100% (OC-CALB-S-100%) se realizó mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes.

En la **figura 31** se muestra el perfil electroforético por SDS-PAGE de los derivados de CALB modificados químicamente por succinilación. En ella se puede observar como el proceso de modificación química no causó la formación de dímeros o macromoléculas sobre la enzima.

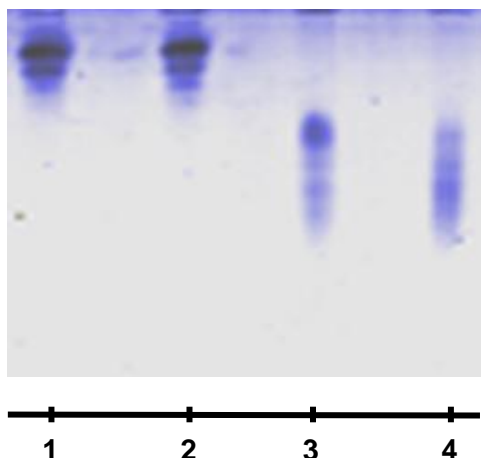
Figura 31. Electroforesis SDS-PAGE de los derivados de OC-CALB succinilados. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: OC-CALB. Carril 3: OC-CALB-S-10%; Carril 4: OC-CALB-S-50%; Carril 5: OC-CALB-S-100%.



La electroforesis en condiciones no desnaturalizantes (Nativa-PAGE) (figura 32) permitió observar como la introducción de grupos carboxilos ionizables sobre la superficie proteica de la enzima, incrementó la densidad de cargas negativas,

alterando con ello la carga neta de la CALB. Este efecto fue notable, en los derivados modificados al 50% y 100%, los cuales presentaron mayores velocidades de migración hacia el ánodo, en comparación con la modificación parcial del 10% y el derivado de CALB no modificado.

Figura 32. Electroforesis PAGE-nativa de los derivados de OC-CALB succinilados. Carril 1: marcador de peso molecular; Carril 2: OC-CALB. Carril 3: OC-CALB-S-10%; Carril 4: OC-CALB-S-50%; Carril 5: OC-CALB-S-100%



3.5.2.1.3 Efecto de la succinilación en la actividad hidrolítica de los derivados modificados de OC-CALB frente al p-NPB. La modificación química con anhídrido succínico ocasionó un cambio en la actividad catalítica de la CALB en la hidrólisis del p-NPB. La **tabla 8** muestra que el incremento progresivo en el grado de modificación de los residuos de lisina superficiales de la enzima con anhídrido succínico, ocasiona una disminución drástica en la expresión de la actividad catalítica de la CALB hasta de un 66% con respecto al derivado enzimático no modificado. Esta caída en la actividad catalítica es debida posiblemente a los cambios conformacionales que sufre la lipasa producto de la introducción de nuevos grupos aniónicos que alteran el potencial electrostático de la superficie de la CALB, generando interacciones electrostáticas repulsivas en la superficie de la

enzima con la consiguiente desestabilización de la estructura terciaria y pérdida de la actividad enzimática (Montes y col., 2006, Barbosa y col., 2012).

Tabla 8. Efecto del grado de modificación con anhídrido succínico sobre la actividad enzimática de los derivados de OC-CALB frente al p-NPB. 100 corresponde a la actividad del derivado de CALB no modificado. Los experimentos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 3.4.

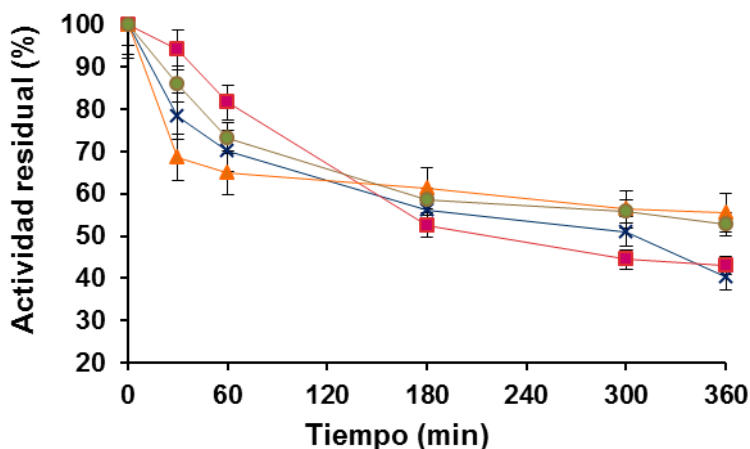
Derivado	Actividad relativa
OC-CALB	100 ± 3
OC-CALB-S-10%	94 ± 1
OC-CALB-S-50%	37 ± 3
OC-CALB-S-100%	34.1 ± 3

3.5.2.1.4 Efecto de la succinilación en la estabilidad térmica y frente a codisolventes de los derivados modificados de OC-CALB La estabilidad térmica de las distintas preparaciones de OC-CALB modificadas químicamente por succinilación, fue evaluada a 70 °C, de acuerdo con lo descrito en la sección de materiales y métodos.

En la **figura 33** se muestra el perfil de inactivación térmica de los diferentes derivados de OC-CALB modificados con anhídrido succínico. Se observa que después de 5 horas de incubación a 70 °C, los derivados de OC-CALB modificados por succinilación al 50% y 100%, perdieron cerca del 45% de la actividad inicial. Aun así, fueron 2 veces más estables que los derivados OC-CALB y OC-CALB-S-10%, los cuales transcurrido el mismo lapso de tiempo habían perdido el 58% de su actividad.

Estos resultados sugieren, que los derivados OC-CALB-S-50% y OC-CALB-S-100% son más estables que el derivado OC-CALB-S-10% y que la enzima no modificada. El incremento en la estabilidad de los derivados OC-CALB-S-50% y OC-CALB-S-100% se debió quizás a que la introducción de un mayor número de grupos aniónicos sobre la superficie proteica de la CALB, generó nuevas interacciones electrostáticas en zonas de la proteína que pudieron estabilizar una conformación más favorable para la lipasa a la temperatura de estudio (Kotormán y col., 2009).

Figura 33. Cursos de inactivación térmica para los diferentes derivados succinilados de CALB. La inactivación térmica se realizó a pH 7 y 70°C, usando como sustrato p-NPB 0.4 mM para determinar la actividad residual. (X) OC-CALB, (■) OC-CALB-S-10%, (▲) OC-CALB-S-50%, (●) OC-CALB-S-100%.



Por otra parte, la estabilidad de los derivados de OC-CALB succinilados fue evaluada en presencia del codisolvente como el tetrahidrofurano (THF). Los derivados fueron incubados en una mezcla de THF (50%(v/v) a 40 °C.

La **tabla 9**, muestra los tiempos de vida media de los diferentes derivados de CALB succinilados, bajo las condiciones de inactivación descritas anteriormente. De allí, se puede observar que el aumento en el grado de modificación con

anhídrido succínico ocasionó una disminución en la estabilidad de la CALB. Por ejemplo, el derivado OC-CALB modificado al 10% fue menos estable en un factor de 1 con respecto al derivado no modificado. Por su parte, los derivados OC-CALB-S-50% y OC-CALB-S-100% fueron menos estables que el derivado no modificado OC-CALB en un factor de 1.5 veces y 2.4 veces, respectivamente,

La introducción de grupos carboxilo sobre la superficie proteica de la CALB ocasiona un efecto negativo en la estabilidad de la enzima frente al THF. Es probable que esta tendencia se deba a que la conformación estructural que adquiere la enzima producto del aumento de la densidad de carga negativa (incremento de repulsiones electrostáticas), permite que el THF penetre de forma más efectiva el entorno micro-acuoso de la enzima, ocasionando la ruptura de interacciones del tipo puente de hidrógeno que desestabilizan más la estructura terciaria de la CALB (Yang y col., 2004; Kotormán y col., 2009; Illanes y col., 2012).

Tabla 9. Tiempos de vida media (horas) de los diferentes derivados modificados de OC-CALB en presencia de tetrahidrofurano 50% v/v a pH 7. Los experimentos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 3.3.2.

Derivado	Tiempo de vida media (h)
OC-CALB	3.1
OC-CALB-S-10%	2.9
OC-CALB-S-50%	2.1
OC-CALB-S-100%	1.3

3.5.2.2 Modificación química de los grupos carboxilo del derivado OC-CALB con etilendiamina. En el proceso de aminación, el efecto de la modificación es más significativo que en la succinilación, debido a la mayor cantidad de grupos

carboxilos reactivos en la superficie de CALB en comparación con los grupos amino (**ver figura 20, capítulo 1**). En este caso, 16 de los 19 grupos carboxilo totales de la CALB inmovilizada sobre octil agarosa fueron involucrados en la modificación, incluido el grupo carboxilo terminal.

Al igual que en la modificación por succinilación en fase sólida de los derivados OC-CALB, se realizaron estudios previos que permitieron concluir que las concentraciones requeridas para obtener los grados de modificación especificados en los objetivos de este trabajo fueron los presentados en la **tabla 10**.

Tabla 10. Concentraciones de EDAC para el control del grado de modificación de los grupos carboxilo de la CALB inmovilizada sobre octil agarosa. Las condiciones de modificación fueron descritas en la sección métodos experimentales, numeral 3.2.1.

Carbodiimida (EDAC) (mM)	Grado de modificación (%)	Referencia
3	10	ND*
10	40-50	López-Gallego, 2005
100	100	Carraway and Koshland Jr, 1966

ND* no determinada en estudios publicados anteriormente.

De igual forma el grado de modificación de los derivados OC-CALB modificados por aminación, fue controlado mediante la concentración del agente activante (carbodiimida) de los grupos carboxilo en el medio de reacción. El incremento de grupos aminos se comprobó mediante la titulación de los grupos amino primarios disponibles en la enzima mediante el ácido picrilsulfónico (TNBS) (Snyder y col., 1975; Montes y col., 2006; Hermanson, 2008). Los derivados de OC-CALB modificados bajo las condiciones descritas en la tabla 10, se nombraron de

acuerdo al grado de modificación así: OC-CALB-EDA-10%; OC-CALB-EDA-50% y OC-CALB-EDA-100%.

Teniendo en cuenta que la modificación química en ningún caso es completamente específica, algunos grupos, por ejemplo, los grupos hidroxilos de las cadenas laterales de los residuos de tirosinas, pueden ser afectados por la carbodiimida. Sin embargo, esta modificación sobre las tirosinas es revertida mediante la incubación de los derivados en una solución de hidroxilamina, obteniendo así nuevamente las tirosinas libres (Carraway y Koshland, 1968). Estos derivados incubados en hidroxilamina se nombraron: OC-CALB-EDA-H-10%; OC-CALB-EDA-H-50% y OC-CALB-EDA-H-100%.

3.5.2.2.1 Caracterización electroforética de los derivados OC-CALB aminados en fase sólida. Al igual que para la caracterización de los derivados succinilados, los derivados aminados de CALB inmovilizados en octil agarosa, fueron caracterizados mediante estudios electroforéticos en condiciones desnaturizantes y no desnaturizantes.

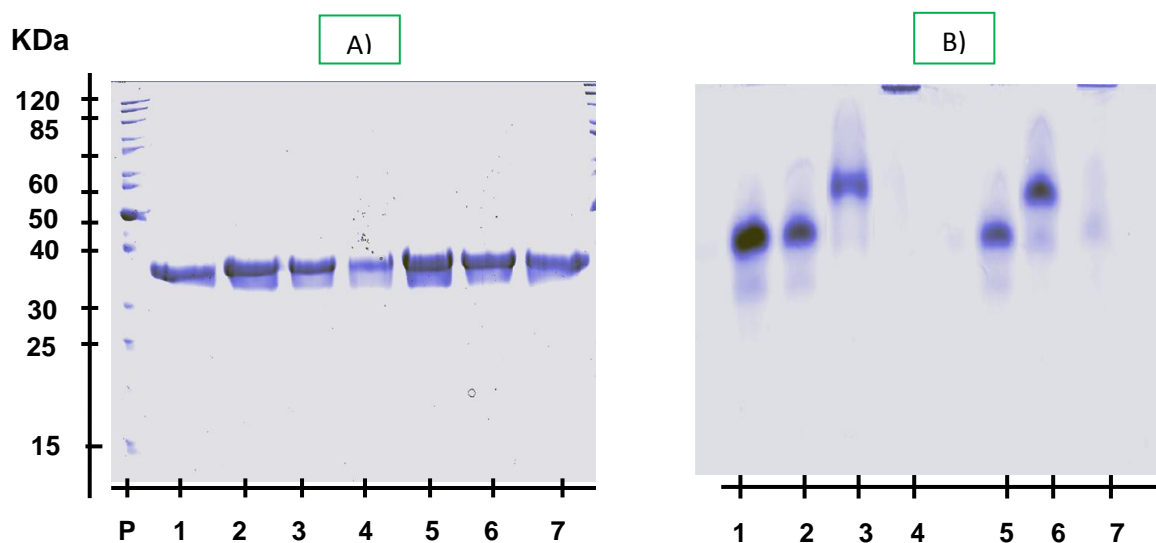
La electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se realizó para comprobar que el proceso de modificación por aminación de los derivados inmovilizados en octil agarosa CALB, no causaba formación de dímeros y oligómeros de la enzima (**figura 34a**).

La electroforesis en condiciones no desnaturizantes (Nativa-PAGE) permitió comprobar el cambio en la densidad de carga causado por los diferentes grados de modificación de la CALB inmovilizada en octil agarosa. La **figura 34b** muestra que la modificación gradual de los grupos carboxílicos (modificación del 10%, 50% y 100%) altera de la misma forma la movilidad electroforética de la CALB. Lo cual sugiere que el punto isoeléctrico de la enzima se modificó de acuerdo con el grado de modificación realizado. Por ejemplo, la modificación del 10% de los grupos

carboxílicos alteró ligeramente la velocidad de migración de la CALB. La modificación al 50% ocasionó un incremento en el punto isoeléctrico de la enzima tal vez cercano al pH del buffer de corrido (pH 8). Por su parte, la modificación masiva (100% de modificación) alteró de forma drástica el punto isoeléctrico de la enzima -de un pI 5.9 a uno por encima de 11- lo cual se vio reflejado en la velocidad de migración en la electroforesis.

Adicionalmente, los derivados de CALB aminados al 10, 50 y 100% fueron incubados en hidroxilamina con el fin de recuperar los grupos hidroxilo de las cadenas laterales de los residuos de tirosina que pudieron haber sido afectados por la carbodiimida previo a la modificación con EDA. La SDS-nativa (figura 34B) muestra que el tratamiento no afectó la movilidad electroforética de los diferentes derivados.

Figura 34. Caracterización electroforética de los derivados de OC-CALB aminados. A) Electroforesis SDS-PAGE. B) Electroforesis nativa-PAGE. Carril P: Marcador de peso molecular. Carril 1: OC-CALB; Carril 2: OC-CALB-EDA-10%; Carril 3: OC-CALB-EDA-50%; Carril 4: OC-CALB-EDA-100%; Carril 5: OC-CALB-EDA-H-10%; Carril 6: OC-CALB-EDA-H-50%; Carril 7: OC-CALB-EDA-H-100%.



3.5.2.2.2 Efecto de la aminación en la actividad hidrolítica de los derivados OC-CALB frente al p-NPB. La aminación gradual de los residuos carboxílicos ionizables en la superficie proteica del derivado OC-CALB no causó un efecto significativo sobre la actividad exhibida por los nuevos derivados obtenidos frente a la hidrólisis del p-NPB (**Tabla 11**).

En la **tabla 11**, se puede observar que los derivados OC-CALB-A-10% y OC-CALB-A-50% retuvieron el 100% de la actividad inicial exhibida por el derivado no modificado. Sin embargo, el derivado de la CALB obtenido por la modificación masiva de sus grupos carboxilo (OC-CALB-EDA-100%) incrementó la actividad en un factor de 1.4 veces con respecto mostrada por el derivado no modificado OC-CALB. Este incremento notable en la actividad enzimática puede deberse a que el aumento en el número de grupos con carga positiva sobre la superficie enzimática de la CALB (16 grupos catiónicos más por molécula), ocasiona posiblemente un cambio conformacional favorable de la enzima, producto de la alteración de las interacciones electrostáticas presentes en su estructura 3D. Adicionalmente, se pueden estar generando cambios en las interacciones del lid con otros sitios de la proteína, generando así cambios en la forma exacta del centro activo de la lipasa (Palomo y col., 2007; Rodríguez y col., 2009).

Por otra parte, el tratamiento de los diferentes derivados modificados de OC-CALB con hidroxilamina para recuperar las tirosinas que posiblemente se vieron afectadas por la activación con carbodiimida, no afectó significativamente la actividad enzimática exhibida por cada derivado.

Tabla 11. Efecto del grado de modificación con EDA sobre la actividad relativa de los derivados de OC-CALB frente al p-NPB. 100 corresponde a la actividad del derivado de CALB no modificado. Los experimentos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos analíticos, numeral 4.1.

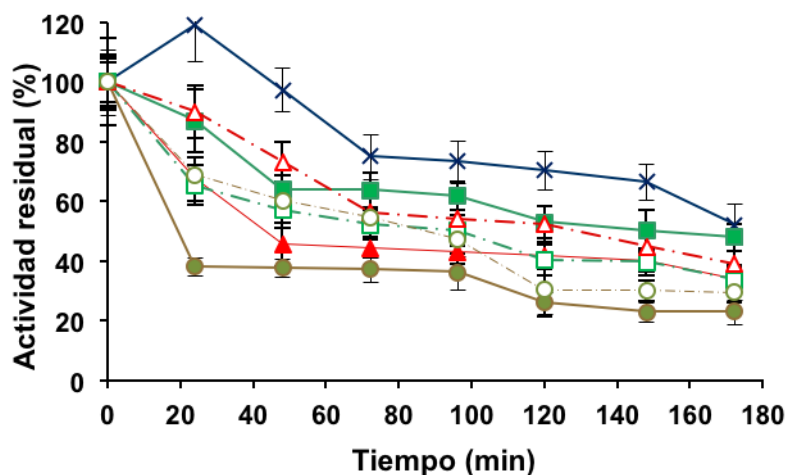
DERIVADO	ACTIVIDAD RELATIVA (%)	
	Derivados tratados sin hidroxilamina	Derivados tratados con hidroxilamina
OC-CALB	100 ± 3	98 ± 2
OC-CALB-EDA-10%	100 ± 7	92 ± 4
OC-CALB-EDA-50%	100 ± 2	102 ± 5
OC-CALB-EDA-100%	140 ± 5	137 ± 3

3.5.2.2.3 Efecto de la aminación en la estabilidad térmica y frente a solventes de los derivados OC-CALB La estabilidad de los diferentes derivados aminados de CALB obtenidos por la modificación gradual con etilendiamina, fue evaluada frente a la temperatura a 70°C y en la presencia de un co-disolvente, en este caso THF (50 % (v/v) a 40°C, de acuerdo con lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 3.3.2.

Los resultados obtenidos (**Figura 35**) muestran que la estabilidad térmica de la CALB inmovilizada en Octil-agarosa se vio afectada por la modificación con etilendiamina. Los tiempos de vida media a 70°C (**Tabla 12**) de los derivados modificados, disminuyeron con el aumento del grado de aminación. Por ejemplo, el derivado OC-CALB-EDA-10% fue 1.2 veces menos estable que el derivado no modificado. Por su parte los derivados OC-CALB-EDA-50% y OC-CALB-EDA-100% fueron 4.5 veces y 10 veces respectivamente, menos estable que el derivado OC-CALB. Se obtuvo un comportamiento similar para los tiempos de vida media de los derivados hidroxil-aminados.

Por lo tanto, la introducción gradual de grupos amino sobre la superficie de la CALB generó una disminución drástica en la estabilidad de la enzima. Este efecto se debió posiblemente a que los grupos catiónicos introducidos alteraron la densidad de carga superficial, causando con ello un cambio conformacional de la lipasa. La nueva conformación adoptada por la enzima es menos estable a la temperatura de estudio debido probablemente a que los nuevos grupos introducidos generan fuerzas de repulsión que no compensan la pérdida de interacciones iónicas inter o intra-moleculares existentes en la conformación de la CALB no modificada. En consecuencia, se generarían grandes cambios conformacionales en la estructura terciaria de la enzima promovidos por la temperatura, lo que causa la disminución de su estabilidad térmica (López-Gallego y col., 2005).

Figura 35. Cursos de inactivación térmica para los diferentes derivados succinilados de CALB. La inactivación térmica se realizó a pH 7 y 70°C, usando como sustrato p-NPB 0.4 mM para determinar la actividad residual. (X) OC-CALB, (■) OC-CALB-EDA-10%, (▲) OC-CALB-EDA-50%, (●) OC-CALB-EDA-100%. Derivados hidroxilaminados: (□) OC-CALB-EDA-H-10%, (△) OC-CALB-EDA-H-50%, (○) OC-CALB-EDA-H-100%.



El estudio de inactivación de los derivados aminados de OC-CALB usando 50%(v/v) de solvente orgánico tetrahidrofurano (THF) a 40°C (**Tabla 12**), mostró en general que la aminación gradual de la CALB con EDA ocasiona posiblemente un cambio conformacional en la estructura 3D de la enzima desfavorable para la estabilidad. Ejemplo de ello, es la disminución en los tiempos de vida media exhibidos por los derivados OC-CALB-EDA-10%, OC-CALB-EDA-50% y OC-CALB-EDA-100% en comparación con el derivado de la enzima no modificada.

Así, OC-CALB-EDA-10% fue 1.15 veces menos estable que el derivado no modificado. Por su parte, los derivados OC-CALB-EDA-50% y OC-CALB-EDA-100% presentaron una estabilidad similar, siendo 3.8 veces menos estables que el derivado OC-CALB.

El tratamiento de los derivados aminados con hidroxilamina para regenerar las tirosinas afectadas por la activación con carbodiimida, permitió recuperar entre un 15 y un 20% de la estabilidad perdida por la modificación, para los derivados OC-CALB-EDA-50% y OC-CALB-EDA-100%. En este estudio, sobresale el incremento en la estabilidad del derivado OC-CALB-EDA-10%, el cual no solo recuperó el 100% de la estabilidad sino que fue 2.13 veces más estable que el derivado no modificado.

Los resultados sugieren que los grupos hidroxilo regenerados en las tirosinas (5 residuos accesibles al medio) forman tal vez interacciones adicionales de tipo puente de hidrógeno con el medio de reacción y con otros aminoácidos próximos en la superficie proteica que estabilizan más la conformación adquirida por la enzima modificada con grupos amino (Rodrigues y Col., 2011; Galvis y Col., 2012).

La **tabla 12**, resume los tiempos de vida media de los diferentes derivados de OC-CALB aminados gradualmente con EDA, al ser incubados en tetrahidrofurano 50% (v/v).

Tabla 12. Tiempos de vida media (horas) de los diferentes derivados modificados de OC CALB en presencia de tetrahidrofurano 50% (v/v) / buffer tris-HCl 50mM de pH 7 a 40°C. Los experimentos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 3.3.2.

Derivados	Tiempos de vida media (h)	
	No hidroxilaminados	hidroxilaminados
OC-CALB	1.5	1.5
OC-CALB-EDA-10%	1.3	3.2
OC-CALB-EDA-50%	0.4	0.3
OC-CALB-EDA-100%	0.4	0.7

3.5.3 Influencia de la naturaleza del soporte de inmovilización sobre el efecto de la modificación de CALB con EDA y anhídrido succínico. Una vez evaluado el efecto de la modificación de la CALB inmovilizada en Octil-agarosa con anhídrido succínico y con etilendiamina, sobre la actividad y estabilidad, se estudió la influencia de la naturaleza del soporte y la orientación de la enzima sobre el mismo, en el efecto final de la modificación. La CALB fue inmovilizada covalentemente sobre el soporte comercial Eupergit C (EC) y modificada totalmente con grupos aminos y grupos carboxilo. Posteriormente, se evaluó la actividad y enantioselectividad de estos derivados frente a sustratos quirales como el (R/S)-mandelato de metilo, (R/S)-propanolol y (R/S)-atenolol.

3.5.3.1 Inmovilización covalente de CALB sobre el soporte Eupergit C (EC). La CALB fue inicialmente purificada por cromatografía de afinidad sobre el soporte Octil-agarosa y posteriormente desorbida del mismo usando tritón x-100, 1% (v/v)

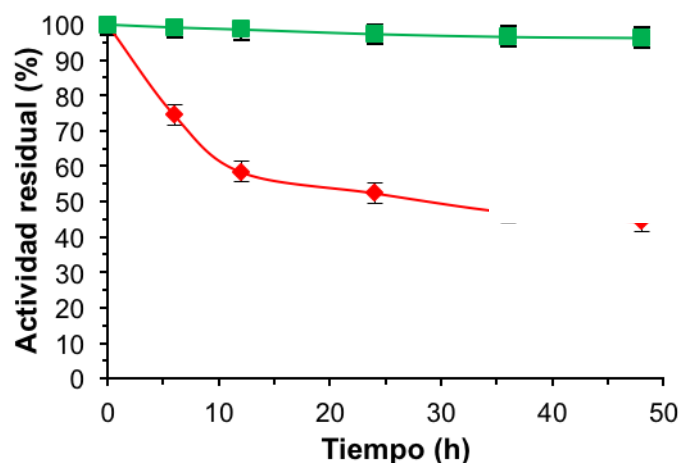
de acuerdo con lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 3.1.1. Una vez obtenido el extracto puro de la enzima, se diluyó la concentración del detergente hasta una concentración final de 0.1% v/v y se realizó la inmovilización sobre el soporte de Eupergit C (EC).

La **figura 36** muestra el curso de inmovilización de CALB sobre el soporte EC a alta fuerza iónica de acuerdo a las condiciones estándar descritas por Wheatley y col., 1999.

La inmovilización de la enzima sobre el soporte EC procedió lentamente, debido a la presencia en el medio de tritón X-100 al 0.1 %(v/v), el cual reduce la adsorción hidrofóbica entre las moléculas de enzima y la superficie del soporte (Wheatley y col., 1996; Mateo y Col., 2000). Después de 48 horas se inmovilizó cerca del 50% de CALB. El derivado obtenido mantuvo alrededor del 90% de la actividad inicial ofrecida al soporte. El derivado se nombró EC-CALB.

Con el fin de caracterizar solo las propiedades biocatalíticas de CALB inmovilizada covalentemente en el soporte EC, el derivado EC-CALB fue incubado en una solución acuosa de tritón X-100 al 1%(v/v) por 48 horas. Este tratamiento permitió desorber el 25% del total de la enzima inmovilizada en el soporte, que correspondió a la fracción de CALB inmovilizada por adsorción hidrofóbica. De esta manera, la carga enzimática final del derivado EC-CALB fue de 1mg de proteína por gramo de soporte.

Figura 36. Curso de inmovilización de la CALB en EC. (■) suspensión enzima-soporte; (◆) sobrenadante.



Finalmente, el derivado EC-CALB fue modificado masivamente (modificación del 100 %) con EDA y con anhídrido succínico de acuerdo a las condiciones descritas anteriormente en la **tabla 10**. El derivado obtenido por aminación fue nombrado EC-CALB-EDA-100% y el obtenido por succinilación EC-CALB-S-100%.

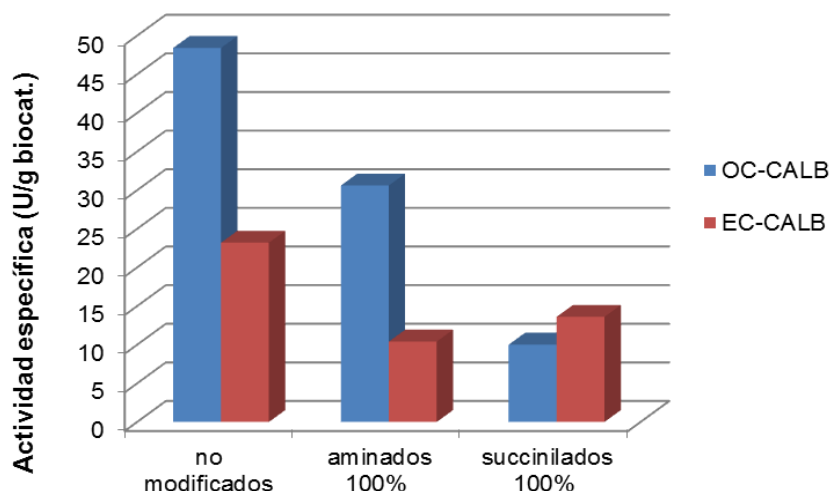
3.5.3.2 Hidrólisis enantioselectiva del (R/S) mandelato de metilo catalizada por lo derivados de OC-CALB y EC-CALB aminados y succinilados. La propiedad catalítica más interesante de las lipasas es la enantioselectividad frente a sustratos quirales. En este caso, se analizó el efecto de la inmovilización y la modificación con etilendiamina y anhídrido succínico sobre la actividad y enantioselectividad de la CALB en la hidrólisis de (R) y (S)-mandelato de metilo.

La **figura 37** muestra que la naturaleza del soporte ocasiona un cambio en la especificidad de la CALB. Se observó que los derivados de OC-CALB fueron claramente más activos (a excepción del derivado OC-CALB-S-100%) en la hidrólisis del (R)-mandelato de metilo, en comparación con los derivados de CALB inmovilizados sobre EC. Los resultados pueden ser explicados por la orientación que adopta la enzima sobre el soporte. Mientras la inmovilización de la CALB

sobre octil-agarosa estabiliza y fija la conformación abierta de la lipasa, la inmovilización sobre el soporte Eupergit C, se da a través de zonas de la enzima que pueden estar lejanas al centro activo y al *lid*. Esto ocasiona que los procesos de modificación puedan perturbar más fuertemente las interacciones entre el *lid* y el centro activo, alterando con ello la forma exacta de este último, y en consecuencia, la actividad catalítica (Schrag y col., 1997; Rotticci y col., 2001; Gutierrez y col., 2007).

El derivado EC-CALB-S-100% el cual fue 1.4 veces más activo en la hidrólisis del mandelato de metilo que el derivado OC-CALB-S-100%. Esto puede deberse a que la inmovilización covalente de la CALB sobre el soporte EC involucra principalmente los residuos de lisina, razón por la cual es probable que el efecto de la modificación con anhídrido succínico sea menor en comparación con el derivado OC-CALB-S-100%.

Figura 37. Efecto de la naturaleza del soporte y la modificación química con EDA y anhídrido succínico sobre la actividad de la CALB en la hidrólisis del (R)-mandelato de metilo.



La enantioselectividad de la CALB en la hidrólisis del (R) y (S)-mandelato de metilo, se vio afectada tanto por la estrategia de inmovilización como por la modificación química realizada (**Tabla 13**). Por ejemplo, el derivado OC-CALB-EDA-100% fue 2.2 veces y 1.4 veces más enantioselectivo que los derivados OC-CALB-S-100% y OC-CALB, respectivamente.

Con el cambio en la naturaleza química del soporte y la orientación de la enzima sobre el mismo, la enantioselectividad de la CALB se vio afectada de manera dramática. Por ejemplo, la disminución de la enantioselectividad del derivado EC-CALB-EDA-100% en un factor de 2.2 veces en comparación con el derivado OC-CALB-EDA-100%. Sin embargo, es de resaltar que la enantioselectividad del derivado EC-CALB se incrementó en un factor de 2.2 veces debido a la aminación con EDA y 1.8 debido a la succinilación.

Por lo tanto, los resultados obtenidos confirman que el efecto de la modificación química en fase sólida sobre las propiedades biocatalíticas de CALB es dependiente de la zona de la proteína involucrada en el proceso de inmovilización y de la rigidez que adopte su estructura 3D sobre la superficie del soporte (Cabrera y Col., 2009; Forde y Col., 2010; Diaz-Rodriguez y Davis, 2010).

Tabla 13. Efecto de la naturaleza del soporte y la modificación química en fase sólida con etilendiamina y anhídrido succínico sobre la enantioselectividad de la CALB catalizando la hidrólisis de (R) y (S)-mandelato de metilo 10 mM, pH 7.

Derivado	Enantiopreferencia	E*
OC-CALB	R	25.5 ± 0.2
OC-CALB-EDA-100%	R	35.6 ± 1.2
OC-CALB-S-100%	R	16.3 ± 0.5
EC-CALB	R	7.5 ± 0.7

Derivado	Enantiopreferencia	E*
EC-CALB-EDA-100%	R	16.6 ± 1
EC-CALB-S-100%	R	13.2 ± 0.8

* El valor E se determinó como la razón: Actividad frente a R-mandelato de metilo / Actividad frente a S-metil mandelato.

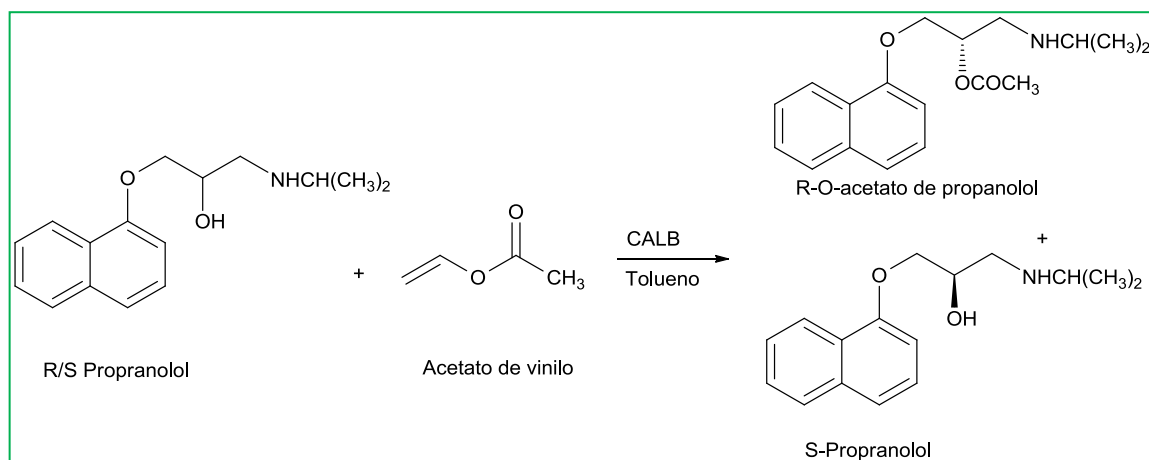
3.5.4 Transesterificación enantioselectiva del (R/S) propanolol y (R/S)-atenolol catalizada por lo derivados de EC-CALB aminados y succinilados.

Se analizó el efecto de la modificación química de los derivados de EC-CALB sobre su enantioselectividad en la reacción de transesterificación del (R/S)-propanolol y (R/S)-atenolol. Estos β -aminoalcoholes son ampliamente usados en la industria farmacéutica como agentes antihipertensivos por sus efectos bloqueadores (antagonista) de los receptores beta-adrenérgicos (Avila y col., 2005).

Aunque la esterificación catalizada por lipasas en solventes orgánicos provee nuevas rutas de síntesis orgánica, deben resolverse diversos problemas como la pérdida de actividad enzimática en medio orgánico y las dificultades asociadas con la reversibilidad de las reacciones de esterificación ocasionadas por el agente acilante (Reetz, 2002; Klivanov, 2001). Por lo tanto, teniendo en cuenta esto, las condiciones de reacción para la trans-esterificación del (R/S)-propanolol y (R/S)-atenolol fueron previamente estandarizadas (**ver anexo 1**).

3.5.4.1 Transesterificación enzimática del (R/S)-Propanolol. La actividad y enantioselectividad de las reacciones de transesterificación de (R/S)-propanolol catalizadas por los derivados de EC-CALB modificados por aminación y succinilación (**figura 38**), fue evaluada en un rango comprendido entre el 15 y 20% de conversión y analizada por HPLC quiral.

Figura 38. Resolución cinética de (R/S)-propanolol catalizada por los derivados modificados de EC-CALB.



Los resultados obtenidos (**tabla 14**) mostraron que el derivado de EC-CALB fue 1.2 veces más activo que los derivados modificados EC-CALB-EDA-100% y EC-CALB-S-100% catalizando la trans-esterificación del (R/S)-propranolol. Esto sugiere que los procesos de modificación realizados – aminación y succinilación – ocasionaron cambios en la especificidad de la enzima si se compara con la actividad mostrada por los mismos derivados en la hidrólisis del mandelato de metilo.

Tabla 14. Enantioselectividad de las preparaciones inmovilizadas de CALB en la transesterificación del propranolol.

Derivado	Enantio-preferencia	Actividad específica (U/g)	ee _p (%)	E
EC-CALB	R	0.61	96	57
EC-CALB-EDA-100%	R	0.49	77.4	9
EC-CALB-S-100	R	0.48	75.7	8

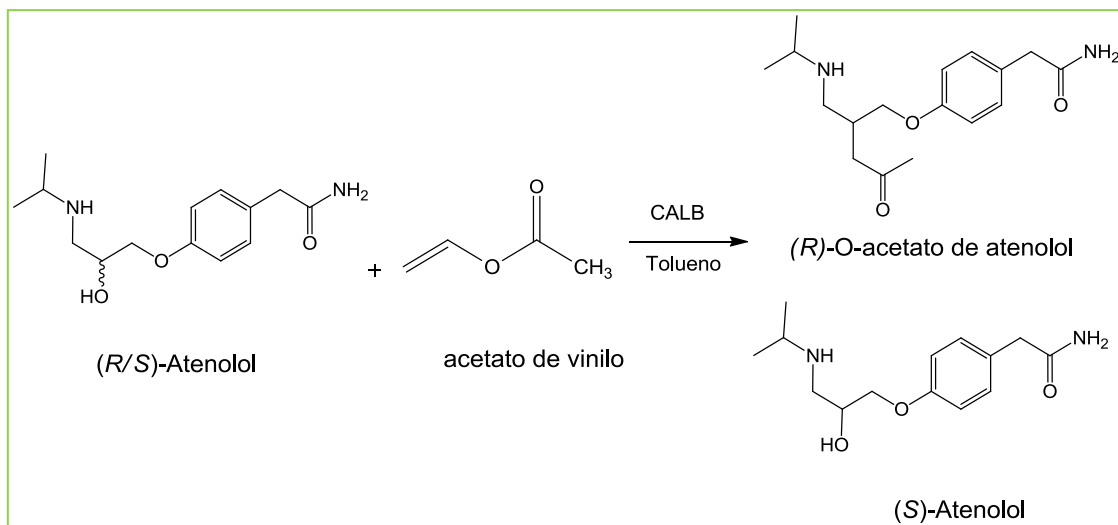
Conversión y ee_p (%) fue estimado por HPLC. Condiciones de reacción: propanolol (0.1mmol), acetato de vinilo (0.3 mmol), derivado (50 mg) y tolueno (hasta completar un volumen total de 3 ml).

Por otra parte, en la **tabla 14** se observa que la modificación química por aminación y succinilación disminuyó de forma dramática la enantioselectividad del derivado de EC-CALB en la trans-esterificación del (R/S)-propanolol. Por ejemplo, el derivado EC-CALB aminado masivamente con EDA (EC-CALB-EDA-100%) fue 6.6 veces menos enantioselectivo que el derivado EC-CALB. Entre tanto, el derivado EC-CALB-S-100% fue 7.2 veces menos enantioselectivo que el derivado no modificado.

Los resultados obtenidos confirman una vez más la hipótesis de que las modificaciones con etilendiamina y anhídrido succínico generan cambios en las interacciones electrostáticas a nivel global en la superficie proteica y a nivel local entre el lid con zonas cercanas al centro activo de la CALB. Es probable que estos efectos repercutieran en la rigidez, orientación y forma exacta del centro activo, alterando con ello la enantioselectividad de la lipasa (Schrag y Col., 1997; Rotticci y col., 2001; Gutierrez y col., 2007).

3.5.4.2 Transesterificación enzimática del (R/S)-Atenolol. De manera similar al propanolol, se evaluó la actividad y enantioselectividad de los diferentes derivados de EC-CALB modificados con etilendiamina y anhídrido succínico en la transesterificación del (R/S)-atenolol (**Figura 39**).

Figura 39. Resolución cinética de (R/S)-Atenolol catalizada por los derivados modificados de EC-CALB.



La **tabla 15**, muestra las actividades y enantioselectividades de los diferentes derivados modificados de EC-CALB. De allí, se puede observar de nuevo que las modificaciones masivas realizadas con etilendiamina y anhídrido succínico sobre el derivado EC-CALB ocasionaron un cambio en la actividad exhibida por la enzima. Por ejemplo, el derivado EC-CALB fue 6 y 7.2 veces menos activo que los derivados EC-CALB-EDA-100% y EC-CALB-S-100%, respectivamente, en la transesterificación enantioselectiva de (R/S)-atenolol.

Estos resultados contrastan con las actividades exhibidas por estos mismos derivados en la transesterificación del (R/S)-propanolol, en donde el derivado EC-CALB fue más activo que los derivados modificados con etilendiamina y anhídrido succínico. Lo anterior sugiere que probablemente las modificaciones químicas realizadas sobre el derivado EC-CALB ocasionaron cambios en la forma exacta del centro activo, con lo cual la especificidad de la lipasa se vio alterada hacia uno u otro sustrato (Cabrera y Col., 2009; Wang y Tsai, 2009; Rodrigues y Col., 2011).

Los derivados modificados de EC-CALB mostraron diferentes valores de E en la transesterificación del (R/S)-atenolol. En la **tabla 15** sobresale la alta enantioselectividad mostrada por el derivado EC-CALB a pesar de ser el derivado menos activo. Por su parte, los derivados EC-CALB-EDA-100% y EC-CALB-S-100% fueron 2.8 y 4.3 veces respectivamente, menos enantioselectivos que el derivado no modificado.

Tabla 15. Enantioselectividad de las preparaciones inmovilizadas de CALB en la transesterificación del (R/S)-atenolol.

Derivado	Enantio-preferencia	Actividad específica (U/g)	ee _p (%)	E
EC-CALB	R	0.11 ± 0.03	96	65
EC-CALB-EDA-100%	R	0.66 ± 0.05	77.4	23
EC-CALB-S-100	R	0.79 ± 0.08	75.7	15

Conversión y ee_p (%) fue estimado por HPLC. Condiciones de reacción: Atenolol (0.05 mmol), acetato de vinilo (0.15 mmol), derivado (50 mg) y tolueno (hasta completar un volumen total de 3 ml).

3.6 CONCLUSIONES

- La modificación gradual con anhídrido succínico y con etielendiamina de la CALB inmovilizada sobre Octil-agarosa ocasionó efectos variados en la actividad de la lipasa frente al p-NPB. Por ejemplo, la carboxilación gradual de la superficie de la CALB con anhídrido succínico ocasionó en general un decrecimiento drástico en la actividad de la enzima (76% para el derivado aminado masivamente) con respecto al derivado no modificado. Sin embargo,

la modificación con etilendiamina (modificación al 100%) mantuvo e inclusive incrementó la actividad de la CALB.

- La introducción de grupos catiónicos y grupos aniónicos sobre la superficie proteica alteró la estabilidad de la CALB frente al efecto de la temperatura (70 °C). En este sentido, la modificación gradual con anhídrido succínico ocasionó una mejora en la estabilidad térmica (factor de 2), mientras que la aminación en general disminuyó de forma dramática la termoestabilidad de la enzima hasta en un factor de 10 veces (derivado modificado 100%).
- En cuanto a la estabilidad en presencia de un co-solvente orgánico como el THF, los derivados de OC-CALB modificados por aminación y succinilación fueron en general menos estables que el derivado no modificado OC-CALB.
- La naturaleza del soporte y la estrategia de inmovilización empleadas juegan un rol importante en el efecto final de la modificación química de la CALB en fase sólida. Por ejemplo, las modificaciones con EDA y anhídrido succínico de los derivados de CALB inmovilizados en Octil agarosa (por adsorción) y Eupergit C (por enlace covalente) produjeron un cambio drástico en la especificidad y enantioselectividad de la enzima en la hidrólisis del (R) y (S)-mandelato de metilo.
- La modificación química por aminación y succinilación del derivado EC-CALB, ocasionó una fuerte caída en el valor de la enantioselectividad de los derivados EC-CALB-EDA-100% y EC-CALB-S-100% en la transesterificación del (R/S)-propanolol. Así, el derivado no modificado EC-CALB (E=57) fue 6.6 y 7.2 veces más enantioselectivo que los derivados EC-CALB-EDA-100% y EC-CALB-S-100%, respectivamente.

- Los derivados EC-CALB-A-100% y EC-CALB-S-100% exhibieron valores de E aceptables en la transesterificación del (R/S)-atenolol (E=23 y E= 15, respectivamente) en comparación con la enantioselectividad exhibida por estos mismos derivados frente al (R/S)-propanolol (E=9, E=8, respectivamente).
- Finalmente es posible concluir que la alteración de la densidad de carga superficial de la CALB a través de la modificación química con etilendiamina y anhídrido succínico permitió alterar las propiedades biocatalíticas de la enzima.

4. MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE LA CALB POR MODIFICACIÓN EN FASE SÓLIDA CON m-POLIETILENGLICOL SUCCÍNICO

4.1 INTRODUCCIÓN

La modificación química de proteínas es una poderosa herramienta que permite modular las propiedades biocatalíticas de las enzimas a través de la alteración de la naturaleza físico-química de la superficie enzimática (Davis, 2003; O'fagain, 2003).

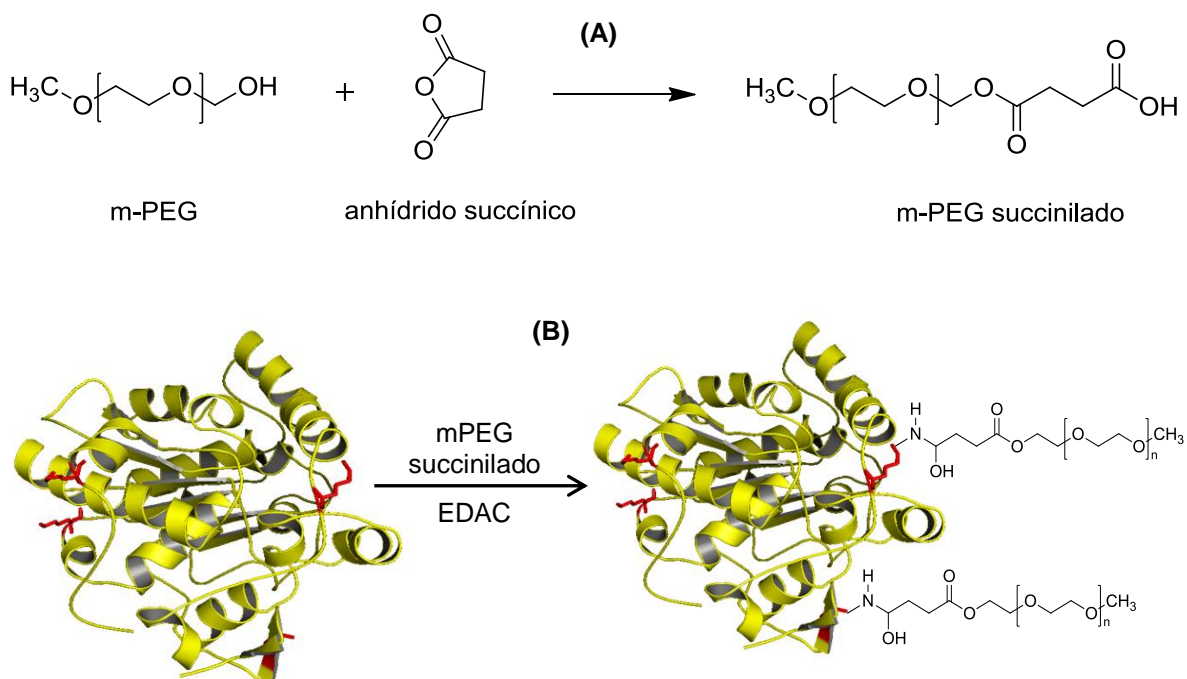
En este sentido, una estrategia estudiada para incrementar la solubilidad, actividad y estabilidad de las enzimas en solventes orgánicos es la modificación de los residuos reactivos de la superficie enzimática con polietilenglicol (PEG) a través de uniones covalentes (Kim y col., 2007; Godoy y col., 2010). Se trata de una modificación de gran aplicación a nivel biológico y terapéutico, cuyos estudios iniciaron en 1970 con la PEGilación de la albúmina y la catalasa (Veronese, 2001). En la actualidad estos estudios se han expandido al campo de la inmunología y la biocatálisis, entre otros.

El PEG es un polímero anfifílico, inerte y no tóxico con residuos de etileno que confieren hidrofobicidad a la cadena incrementado la solubilidad en medio orgánico, y un oxígeno que permite fuertes interacciones con el agua, lo que ayuda a mantener el microambiente acuoso de la enzima modificada, resultando esencial para la actividad en solventes orgánicos (Bailon y Berthold, 1998; Hernaíz y col., 1999; Pozzo y col., 2000; Roberts y Col., 2002; Godoy, y col., 2009; Pinholt y col, 2010).

La conjugación del PEG a otras moléculas se hace a través de dos grupos hidroxilo terminales de la cadena lineal. Este proceso es típicamente hecho por la generación de un intermediario electrofílico (PEG activado) capaz de acoplarse espontáneamente a un residuo nucleofílico de una segunda molécula (proteína). Dentro de los agentes activantes del polietilenglicol se encuentra el cloruro cianúrico que es altamente tóxico y otros agentes menos tóxicos como p-nitrofenil cloroformato, succinimidil succinato o carbonato, cloruro de tresilo, diclorotriazina entre otros (Koops y col., 1999; Veronese, 2001; Roberts y col., 2002).

De las rutas utilizadas para llevar a cabo la PEGilación de proteínas y que han sido documentadas por Koderá y colaboradores (1998), Roberts (2002) y Kim y colaboradores (2007), se encuentra aquella en la que el PEG es activado con grupos funcionales adecuados para la reacción de aminas primarias o ϵ -amino de los residuos de lisina a través de la generación de un intermediario carboxílico como por ejemplo el mPEG-COOH, SS-mPEG (succinimidil succinato mPEG) (figura 40).

Figura 40. Modificación de enzimas con mPEG. A) Activación de PEG con anhídrido succínico. B) Modificación de CALB con mPEG-succínico.



Woghiren y colaboradores (1993), Godoy y colaboradores (2010) utilizaron agentes activantes con presencia de grupos tiol para activar polietilenglicoles que posteriormente reaccionaron con los grupos tiol de las cisteínas (los cuales se encuentran en menor proporción que las lisinas en la superficie enzimática) de la papaína y de la lipasa de *Geobacillus thermocatenulatus* BTL2. De esta manera, se generaron modificaciones sitio dirigidas tras la formación de enlaces di-sulfuro.

La efectividad de la modificación química con PEG es altamente dependiente del tipo de activación del polímero y del número de residuos aminoacídicos sobre la superficie enzimática susceptibles a la modificación (Veronese, F., 2001; Kim y col., 2007). La CALB dispone sobre la superficie proteica de 9 residuos lisínicos accesibles a la modificación con mPEG-COOH. Sin embargo, es probable que la reacción de modificación se vea afectada por el número limitado de lisinas (Veronese, F., 2001; Kim y col., 2007). Por lo tanto, es posible que una modificación previa de CALB con EDA, permita incrementar de manera notable el número de grupos amino por molécula de lipasa, facilitando con ello la posterior reacción de modificación con mPEG-COOH.

De acuerdo con lo descrito en los capítulos 1 y 2, la aminación de CALB en fase sólida permite mantener (o incluso aumentar bajo ciertas condiciones y sustratos) en un alto porcentaje la actividad y estabilidad de la enzima (Rodrigues y col., 2011; Galvis y Col., 2012). Tal vez, la ventaja más importante de la aminación de proteínas con EDA es que los nuevos grupos amino introducidos sobre la superficie proteica de la enzima tienen un valor de pK más bajo (pK 9.2), que los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina (pK 10.2). Por tanto, la aminación de la superficie de la enzima permite disponer de grupos amino más reactivos que pueden facilitar la modificación masiva de la enzima con el PEG succinilado (Fenández-Lafuente y col., 1998; Rodrigues y col., 2011).

Las lipasas son las enzimas más utilizadas en biocatálisis (Gandhi, 1997; Pandey y Col., 1999) y en muchas ocasiones han sido objeto de la modificación con PEG para incrementar su solubilidad en medios orgánicos. Además, teniendo en cuenta el mecanismo de acción de las lipasas, que implica una gran movilidad en las proximidades del centro activo debido a su mecanismo de activación interfacial, es probable que cualquier modificación en su superficie proteica ocasione en gran medida la alteración de sus propiedades biocatalíticas finales.

Se han reportado muchos ejemplos de la alteración de las propiedades de las lipasas por inmovilización (Mateo y col. 2007; Hernandez y Fernández-Lafuente, 2011; Rodrigues y col., 2012), modificación química (Palomo y col., 2007; Rodrigues y col., 2011; Marciello y col., 2012), ingeniería del medio y manipulación genética (Kaur y Sharma, 2006; Turner, 2009). En este sentido, la modificación de la enzima con PEG -un polímero grande e hidrofóbico- no solo puede incrementar la solubilidad de la misma en medio orgánico, también puede alterar la movilidad del *lid* (debido al gran tamaño del agente modificante) y con ello la conformación exacta del centro activo (por la alteración de las interacciones en la superficie proteica). Adicionalmente, el efecto de la modificación química es dependiente del protocolo de inmovilización.

Por lo tanto, en este capítulo, se estudió la alteración de las propiedades biocatalíticas de CALB a través de una nueva estrategia de modificación que involucra la introducción de cadenas poliméricas de polietilenglicol succinato (vía activación con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) sobre la superficie enzimática de CALB inmovilizada sobre el soporte Octil-agarosa. Adicionalmente, se analizó el efecto de la aminación de la CALB en fase sólida y su posterior modificación de manera controlada mediante la reacción entre los nuevos grupos amino introducidos con m-PEG-COOH.

4.2 MATERIALES

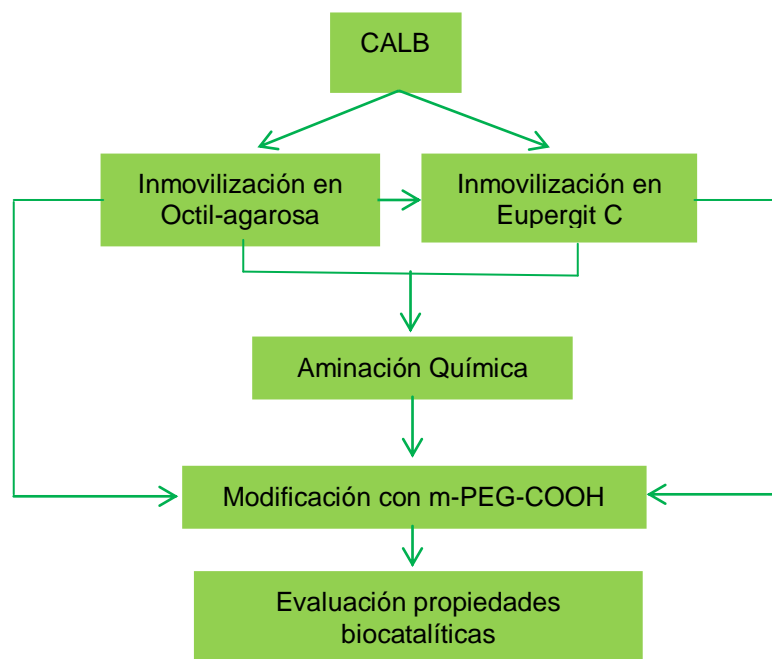
La lipasa B de *Candida antarctica* (CAL-B) fue obtenida de Novozymes. El Octil agarosa 4BCL, Tritón X-100, p-nitrofenilbutirato (pNPB), el ácido picril sulfónico (TNBS), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC), N-hidrosuccinimida (NHS), el monometoxi polietilenglicol Mn 5000 (mPEG), (R/S)-mandelato de metilo, (R/S)-Propanolol-HCl, (R/S)-Atenolol-HCl y cada uno de los isómeros puros fueron obtenidos de Sigma Aldrich (St. Louis, Mo, USA). El soporte de Eupergit C fue donado por Rohm Pharma (Darstamdt, Alemania). Los marcadores de peso molecular de proteínas para electroforesis de proteínas 1D se obtuvieron de Fermentas. Los reactivos utilizados en la síntesis y en las reacciones fueron todos de grado analítico y suministrado por Sigma Aldrich y Merck.

4.3 MÉTODOS EXPERIMENTALES

En la **figura 41** se presenta el esquema de la metodología propuesta para el logro de los objetivos. Inicialmente, la CALB fue inmovilizada por adsorción interfacial sobre geles de Octil-agarosa (OC-CALB). Posteriormente, el derivado obtenido OC-CALB fue modificado con mono-metoxi polietilenglicol (m-PEG-COOH) siguiendo dos rutas diferentes: 1) Una vez obtenido el derivado OC-CALB, fue aminado masivamente con EDA y posteriormente modificado con m-PEG-COOH. 2) el derivado OC-CALB fue modificado directamente con el m-PEG-COOH. En ambos casos el grado de pegilación fue controlado.

Las condiciones de modificación fueron estudiadas en el derivado de CALB inmovilizada de forma covalente sobre el soporte Eupergit C (EC-CALB). Finalmente, se evaluó el efecto de la modificación con PEG sobre las propiedades biocatalíticas de los derivados OC-CALB y EC-CALB.

Figura 41. Metodología general realizada para la modificación de la CALB con PEG.



4.3.1 Inmovilización de CALB sobre diferentes soportes. La CALB fue inmovilizada mediante dos protocolos de inmovilización diferentes. Uno que involucraba la adsorción reversible de la enzima sobre el soporte Octil-agarosa. Y el otro a través de la formación de enlaces covalentes entre los grupos amino de los residuos lisínicos de CALB y los grupos epóxicos del soporte Eupergit C.

4.3.1.1 Inmovilización de CALB por adsorción hidrofóbica sobre Octil-agarosa (OC). La CALB fue inmovilizada a baja fuerza iónica de acuerdo a lo propuesto por Bastidas y col., 1998. Un ml del extracto comercial de CALB, con una concentración de proteína de 5.9 mg/ml y una actividad específica de 4.9 U/mg, fueron diluidos en 99 ml de buffer fosfato de Sodio 5 mM de pH 7. A continuación, se adicionaron 10 gramos secos de soporte Octil-agarosa. Periódicamente, se evaluó el proceso de inmovilización de CALB sobre el soporte, midiendo la actividad residual de la suspensión y el sobrenadante en la hidrólisis del p-NPB (Ver numeral 4.1). Después de 3 horas a 4 °C, bajo agitación constante

a 250 rpm, la suspensión de inmovilización fue filtrada y la lipasa inmovilizada fue lavada 3 veces con agua destilada y buffer fosfato de sodio 25 mM de pH 7. El derivado fue llamado OC-CALB.

4.3.1.2 Inmovilización de CALB en Eupergit C. Para la inmovilización de CALB en el soporte Eupergit C, la lipasa fue previamente purificada mediante cromatografía de adsorción interfacial a baja fuerza iónica sobre Octil-agarosa (ver numeral 3.1.1) y desorbida del soporte con tritón x-100 como se describe a continuación:

Purificación de CALB

2. ml del extracto comercial de la CALB (concentración de proteína de 5,9 mg/ml) fueron diluidos en 98 ml de buffer fosfato de Sodio 5 mM de pH 7 (relación 1/50) y adicionados a 10 gramos de Octil-agarosa. Transcurridas 3 horas del proceso, la enzima adsorbida fue filtrada y lavada con agua destilada. A continuación, la CALB adsorbida en Octil-agarosa fue re-suspendida en 100 mL de buffer fosfato de sodio (5 mM) de pH 7, que contenía tritón X-100 al 1% (v/v). Este tratamiento permitió desorber la enzima purificada del soporte (Bastida y col., 1998;; Fernández-Lorente y col., 2008).

Inmovilización de CALB en Eupergit C.

1 gramo del soporte Eupergit C, fue suspendido en 10 mL de solución enzimática previamente purificada que contenía buffer fosfato de sodio 1M de pH 7 y tritón X-100 al 0.1% (v/v). Periódicamente, se evaluó el proceso de inmovilización de la CALB sobre el soporte, midiendo la actividad residual de la suspensión y el sobrenadante en la hidrólisis del p-NPB (Ver numeral 4.1). Una vez finalizado el proceso de inmovilización, la suspensión fue filtrada y lavada 3 veces con buffer fosfato de sodio 25 mM de pH 7.

Finalmente, el derivado de CALB obtenido fue incubado en 5 mL de una solución de fosfato de sodio (50 mM) que contenía glicina-HCl 1M a pH 8.5, con el fin de bloquear los grupos epoxi que no participaron en la inmovilización. Después de 24 horas de incubación el derivado fue lavado con agua destilada y buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7, y almacenados a 4 °C. El derivado fue llamado EC-CALB.

4.3.2 Modificación de OC-CALB y EC-CALB con Etilendiamina (EDA) y con mono-metoxi polietilenglicol succínico (m-PEG-COOH). La CALB inmovilizada previamente sobre los soportes octil-agarosa (OC-CALB) y Eupergit C (EC-CALB) fue modificada por dos rutas. 1) la CALB fue directamente modificada con m-PEG-COOH. 2) la enzima fue aminada masivamente y a continuación modificada con m-PEG succínico.

4.3.2.1 Aminación de los derivados OC-CALB y EC-CALB. Un gramo de derivado OC-CALB fue incubado en 10 mL de una solución de EDA 1M a pH 4.75 bajo agitación continua. La reacción de modificación del derivado de CALB se inició con la adición de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) 10mM. Después de 90 minutos de agitación a temperatura ambiente, los derivados aminados de CALB se lavaron con buffer fosfato 25mM, pH 7 y un exceso de agua destilada y se filtraron al vacío (Carraway y Koshland, 1966; Cabrera y col., 2009; Rodríguez y col., 2009).

Una vez obtenido el derivados de CALB modificado por aminación (OC-CALB-EDA), fue incubado en hidroxilamina-HCl 1M a pH 7 durante aproximadamente una hora a 25°C para recuperar los residuos hidroxilo de las tirosinas que hubieran resultado afectados por el proceso de modificación química (Carraway y Koshland, 1968; Geoghegan, 2001; Hermanson, 2008).

El procedimiento anterior fue realizado de forma similar para los derivados de CALB inmovilizados covalentemente sobre el soporte Eupergit C (EC-CALB). El derivado obtenido se nombró como EC-CALB-EDA.

4.3.2.2 Modificación de los derivados OC-CALB, OC-CALB-EDA, EC-CALB y EC-CALB-EDA con m-PEG-COOH. Para la modificación de los derivados OC-CALB, OC-CALB-EDA, EC-CALB y EC-CALB-EDA con polietilenglicol, el PEG fue previamente activado con grupos carboxilo como se describe a continuación:

4.3.2.2.1 Preparación de mPEG-COOH. La activación del PEG se realizó de acuerdo a lo descrito por Godoy y Col. (2009): 15 gramos de mono-metoxi-polietilenglicol (mPEG) y un gramo de anhídrido succínico (relación molar 1:1) fueron disueltos en 100 ml de CH_2Cl_2 . Para facilitar la disolución del anhídrido se adicionó 1.3 mL de trietil-amina y la mezcla se mantuvo en agitación constante a 25 °C. Transcurridas 20 horas de reacción, el solvente fue removido a través de rota-evaporación y el producto obtenido (mPEG-COOH) fue caracterizado mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) comparándolo con el espectro FTIR del m-PEG sin modificar (Ver anexo 1 datos espectrales) (Son y col., 2007; Godoy y col., 2009).

4.3.2.2.2 Modificación de OC-CALB, OC-CALB-EDA, EC-CALB y EC-CALB-EDA con m-PEG-COOH. Un gramo del derivado de OC-CALB se incubó en una solución de metoxi-polietilenglicol succinilado (mPEG-COOH) 10mM a pH 8. La reacción de modificación se inició con la adición de 19.2 mg de EDAC, para obtener una concentración final de 100mM de carbodiimida (EDAC). Trascurridos 90 minutos de reacción con agitación constante a temperatura ambiente, el derivado OC-CALB-EDA-PEG fue lavado con un exceso de agua destilada, filtrado al vacío y almacenado a 4 °C (Hermanson, 2008; Godoy y Col., 2009). El derivado obtenido fue llamado OC-CALB-PEG.

El procedimiento anterior fue realizado de forma similar con los derivados OC-CALB-EDA, EC-CALB y EC-CALB-EDA. Los biocatalizadores obtenidos mediante el tratamiento con mPEG-COOH fueron llamados OC-CALB-EDA-PEG, EC-CALB-PEG y EC-CALB-EDA-PEG.

4.3.3 Efecto de la modificación de los derivados OC-CALB y EC-CALB con EDA y PEG sobre la actividad enzimática frente al p-NPB. La actividad enzimática de los derivados OC-CALB y EC-CALB modificados con EDA y PEG fue evaluada en la hidrólisis del p-NPB, de acuerdo a lo descrito en el numeral 4.1.

4.3.4 Evaluación de la estabilidad de los derivados de OC-CALB modificados con EDA y PEG. La estabilidad de los derivados OC-CALB aminados y PEGilados fue evaluada frente a una temperatura de 60°C y en presencia de 50% de tetrahidrofurano (THF)/ buffer Tris-HCl 50mM a pH 7 a 40°C.

4.3.4.1 Estabilidad térmica. La termo-estabilidad de los derivados OC-CALB, OC-CALB-EDA y OC-CALB-EDA-PEG se determinó por triplicado a 70°C tal como se describe a continuación:

500 mg del respectivo derivado de OC-CALB fueron incubados en 5 ml de buffer fosfato 25 mM de pH 7. Periódicamente, se extrajeron 100 µL de suspensión y se determinó la actividad residual usando como sustrato p-NPB. (Ver sección 4.1).

4.3.4.2 Estabilidad frente a THF. Los derivados OC-CALB, OC-CALB-EDA y OC-CALB-EDA-PEG fueron incubadas en una mezcla al 50% de tetrahidrofurano (THF)/ buffer Tris-HCl 50 mM a pH 7 y a 40 °C. Periódicamente, se extrajeron 100 µL de suspensión para evaluar la actividad enzimática residual frente al sustrato p-NPB tal como se describe en el punto 4.1.

4.3.5 Evaluación de la especificidad y enantioselectividad de los derivados modificados de la CALB. La especificidad y enantioselectividad de los derivados modificados de la CALB fue evaluada en la reacción de hidrólisis de (R) y (S)-Mandelato de metilo y en las transesterificaciones de los aminoalcoholes (R/S)-propanolol y (R/S)-atenolol

4.3.5.1 Estudio del efecto de la modificación química de los derivados EC-CALB y OC-CALB con EDA y PEG sobre la hidrólisis enantioselectiva del (R/S) mandelato de metilo La actividad enzimática y enantioespecificidad de los derivados OC-CALB, OC-CALB-EDA, OC-CALB-EDA-PEG , EC-CALB, EC-CALB-EDA y EC-CALB-EDA-PEG fue evaluada en la hidrólisis en medio acuoso del mandelato de metilo, de forma similar a lo descrito en el capítulo 1, sección 3.5 de la tesis doctoral.

4.3.5.2 Estudio del efecto de la modificación química de los derivados EC-CALB, sobre la trans-esterificación enantioselectiva de (R/S)-propanolol y (R/S)-atenolol. Se evaluó la enantioselectividad de los derivados EC-CALB, EC-CALB-EDA y EC-CALB-EDA-PEG en las reacciones de trans-esterificación de los sustratos quirales propanolol y atenolol (curvas de calibración anexo 2). Se utilizó acetato de vinilo como donador acilo y tolueno como solvente orgánico (Barbosa y col., 2011).

Inicialmente, se preparó una solución 200 mM de (R/S)-propanolol (o atenolol) en metanol para facilitar la dilución de los mismos. A continuación, para las reacciones de trans-esterificación del propanolol se llevó a cabo la siguiente mezcla de reacción: 0.1 mmol (25.93 mg) de (R/S)-propanolol, 0.3 mmol (27.71 μL) de acetato de vinilo y tolueno hasta completar un volumen final de 3 mL. La reacción inició con la adición de 50 mg de derivado enzimático (EC-CALB-A, EC-CALB-PEG, EC-CALB-S).

Finalmente, para las reacciones de transesterificación del atenolol, se fijó un volumen de reacción en 3mL conformados por: 0.05 mmol (13.3 mg) de (R/S)-atenolol, 0.1 mmol (9.23 μ L) de acetato de vinilo y tolueno hasta completar el volumen final. La reacción inició con la adición de 50 mg del derivado enzimático (EC-CALB, EC-CALB-EDA y EC-CALB-EDA-PEG) (Barbosa y col., 2011).

Los productos de la reacción fueron determinados por HPLC en fase reversa, usando un equipo HPLC (Agilent 1100) con una columna Zorbax C-18 (5 μ m, 250 x 4.6mm). La fase móvil consistió de una mezcla isocrática de acetonitrilo-buffer fosfato 25 mM pH 6, en una proporción volumétrica 70:30 (v/v). Los compuestos se determinaron utilizando un detector con arreglo de diodos UV a 289 nm y un flujo de 1 mL/min, con un volumen de 5 μ l de inyección y tiempos de retención de 2.8 min R-propanol, 3.0 min S-propanol, 3.4 min R butiril propanol, 2.8 min R-atenolol, 2.9 min S-atenolol, 3.3 min R-O-acetil atenolol y 6.4 min para el tolueno.

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.4.1 Determinación estándar de la actividad enzimática frente al p-nitrofenil-butirato (p-NPB). La actividad catalítica de CALB se cuantificó de forma continua a través del método de velocidades iniciales de reacción. El ensayo se llevó a cabo midiendo el aumento en el valor de absorbancia a 348 nm, producido por la formación del producto p-nitrofenol (coeficiente de extinción molar= $5150 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) generado por la hidrólisis de p-NPB 0.4 mM, disuelto en tampón fosfato sódico 25 mM de pH 7 y a 25 °C. Para iniciar la reacción, 100 μ L de solución lipásica se añadieron a 2.5 mL del sustrato. Una unidad internacional de actividad enzimática fue definida como la cantidad de lipasa que es necesaria para hidrolizar 1 μ mol de p-NPB por minuto (IU) bajo las condiciones descritas anteriormente.

4.4.2 Determinación del grado de modificación. El grado de modificación fue determinado mediante la titulación de los grupos aminos primarios usando la metodología del ácido picril sulfónico (Montes et al., 2006; Snyder et al., 2005). A 350 mg derivado enzimático de CALB modificado, se adicionaron 3 mL de solución de ácido picril sulfónico o TNBS 0.1% (p/v) a pH 8. Después de 30 minutos de reacción a temperatura ambiente, el derivado se lavó con agua destilada. 200 mg se resuspendieron en 2.1 mL de borato de sodio 1M pH 9 y la medición de absorbancia se llevó a cabo a 430nm. Se usó como blanco de reacción octil-agarosa libre de enzima.

4.4.3 Estudios electroforéticos de los derivados modificados de CALB

4.4.3.1 Electroforesis en condiciones desnaturizantes. En la electroforesis en condiciones desnaturizantes o SDS-PAGE (Laemmli 1970), se utilizó el buffer de ruptura (Tris-HCl 62,5 mM pH 6.8, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanol, 5% glicerol) y geles de poliacrilamida al 12%(p/v) en la zona de separación y de 5% (p/v) en la zona de concentración. A 10 mg de derivado enzimático se le adicionaron 30 μ L de buffer de ruptura y se calentaron en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos. Posteriormente, fueron mantenidas en baño de hielo durante 5 minutos. Finalmente, se adicionaron 20 μ L de muestra. La electroforesis se llevó a cabo en un equipo PowerPac HC (BIORAD), a temperatura ambiente y a un voltaje de 150V durante 1 hora.

4.4.3.2 Electroforesis en condiciones no desnaturizantes (nativa-PAGE). Para la electroforesis en condiciones no desnaturizantes o nativa-PAGE (Laemmli, 1970 modificado), 50 mg de derivado enzimático fueron re-suspendidos en 0.5 mL de una solución de Tritón al 1% (v/v) en buffer fosfato 25mM pH 7 por 24 h a 4 °C. Al sobrenadante se le adicionó buffer de corrida sin SDS ni mercaptoetanol. Finalmente, se adicionaron 20 μ L de muestra en geles de concentración 5%(p/v) y de separación 12%(p/v) de poliacrilamida sin SDS, a

temperatura ambiente y a un voltaje de 150 V durante 4h en un equipo PowerPAC HC (BIORAD). El revelado de las proteínas se realizó mediante tinción con azul brillante de Coomassie R-250 y usando marcadores de peso molecular (200-7 kDa). Los geles obtenidos fueron posteriormente escaneados con un densitómetro UMAX PowerLook 2100XL y visualizados a través del software PDQuest (Biorad).

4.4.4 Determinación del exceso enantiomérico (ees y eep) y de la enantioselectividad (E) de una reacción reversible. Los excesos enantiomérico (ee_s) del S-Propanolol, del S-Atenolol y del éster formado (ee_p) se analizaron por HPLC quiral (curvas de calibración en anexo 5), cuando la reacción enzimática alcanzó una conversión de 20-30%. Los productos de reacción se determinaron usando una columna quiral (ES-OVM, Agilent technologies, USA). Para su separación se utilizó como fase móvil una mezcla isocrática de metanol/buffer fosfato pH 6 (30:70 v/v) a un flujo de 1 mL/min utilizando un equipo de HPLC (Agilent 1100). La relación enantiomérica se calculó usando un estándar interno y la ecuación reportada por Chen y col.,(1982).

4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.1 Inmovilización de CALB en Octil-agarosa. La CALB fue inmovilizada por adsorción interfacial a baja fuerza iónica, de acuerdo con lo propuesto por Bastida y Col., (1998). Los resultados obtenidos señalan que al cabo de 60 minutos de incubación de la suspensión enzimática, se logró una inmovilización del 95 % de la CALB, con una carga enzimática de 1mg de proteína/g soporte. El derivado fue nombrado como OC-CALB.

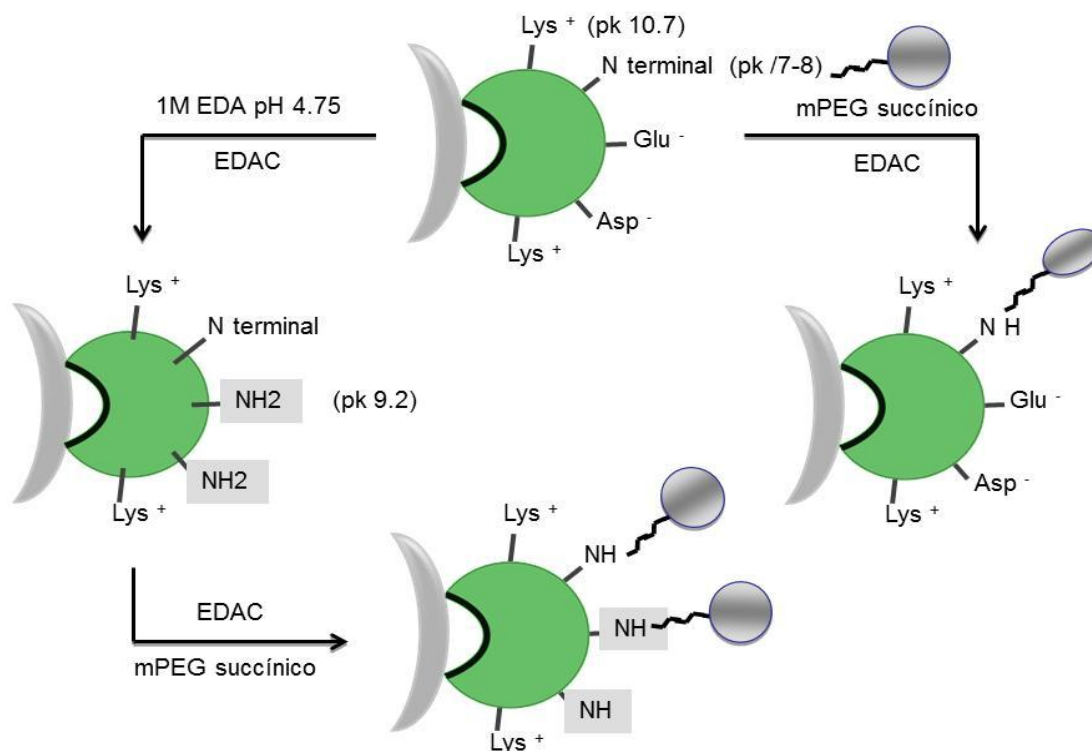
4.5.2 Modificación del derivado OC-CALB con Etilendiamina (EDA) y con mono-metoxi polietilenglicol succínico (m-PEG-COOH). El derivado de OC-CALB fue modificado a través de la introducción de cadenas hidrofóbicas de

metoxi-poli-etilenglicol succínico (m-PEG-COOH) de acuerdo con lo propuesto por Godoy y Col., (2009). El m-PEG-COOH contiene un grupo carboxílico terminal que reacciona con los grupos amino, principalmente los ϵ -amino de los residuos de lisina.

Teniendo en cuenta que la CALB dispone de 9 residuos de lisina (y del grupo amino terminal de la leucina) accesibles a la modificación química, se intentó introducir 9 cadenas de mPEG por molécula de lipasa. Para lograr este fin, se incrementó el pH de reacción de pH 5 a pH 7, además se usó una concentración máxima de carbodiimida de 100 mM y una concentración de mPEG succínico de 10 mM. Sin embargo, a pesar que las condiciones de reacción fueron modificadas para favorecer la reacción entre los grupos amino de la enzima y el grupo carboxílico del PEG, los resultados obtenidos señalaron que la superficie proteica de CALB permaneció inalterada. Así lo indicó, la titulación de los grupos amino de la enzima con TNBS después de la reacción con mPEG succínico.

Debido a la dificultad para modificar la superficie enzimática de la CALB con m-PEG, se utilizó una estrategia diferente, introduciendo inicialmente grupos amino sobre la superficie proteica de la enzima, aprovechando que esta dispone de 15 grupos carboxílicos accesibles a la modificación química con EDA. Esto permitió incrementar notablemente el número de grupos amino primarios disponibles por molécula de la CALB (de 10 grupos a 25 grupos amino) para ser modificados mediante la reacción con el m-PEG succínico. Adicionalmente, los nuevos grupos introducidos presentan un valor de pK inferior al valor que exhiben los grupos ϵ -amino de los residuos lisínicos, lo cual podría favorecer aún más la reacción de modificación química (**Figura 42**).

Figura 42. Representación esquemática de la estrategia utilizada para la modificación masiva de la superficie del derivado OC-CALB.



La modificación del derivado OC-CALB-EDA con m-PEG-COOH bajo las condiciones experimentales descritas por Godoy y Col., 2009 (10 mM de mPEG succínico y 100 mM de EDAC) produjo una disminución significativa en la cantidad de grupos amino primarios libres en la superficie proteica de CALB. Lo anterior sugiere que el derivado OC-CALB-EDA fue altamente modificado con las cadenas poliméricas del PEG (**tabla 16**). Sin embargo, es relevante el hecho que al titular el derivado OC-CALB-EDA-PEG con TNBS, la concentración de grupos amino primarios libres es similar a la mostrada por el derivado OC-CALB. Esto sugiere, que bajo las condiciones de reacción, solo fueron modificados con PEG los grupos amino introducidos por el tratamiento con EDA, mientras que los residuos de lisina permanecieron inalterados.

Tabla 16. Titulación de los grupos amino libres tras la modificación secuencial con EDA y mPEG. El 100% del valor de Absorbancia corresponde a la absorbancia desarrollada por el derivado OC-CALB después de la titulación con TNBS.

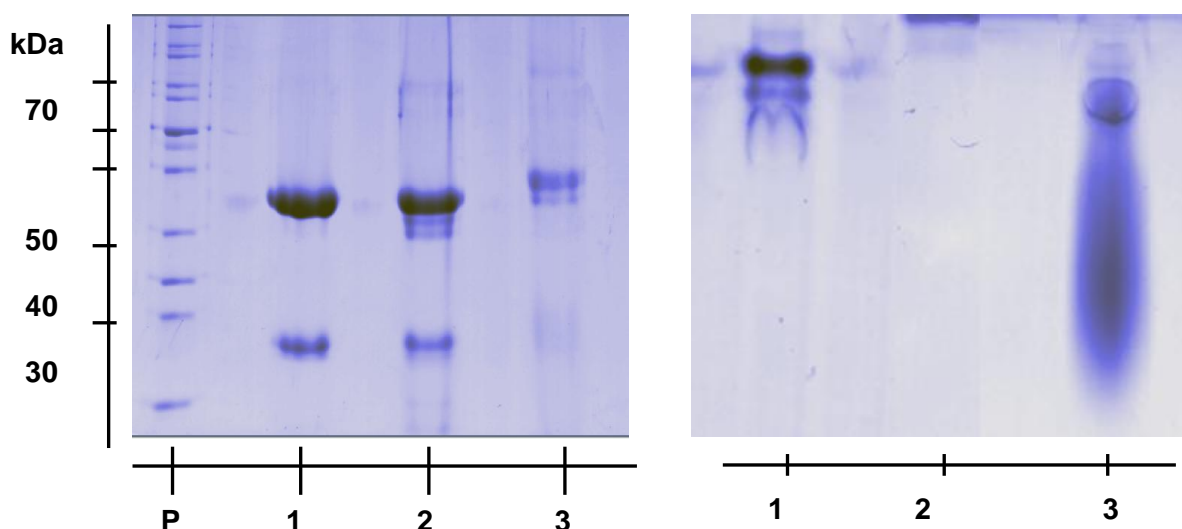
Derivado	Abs después de la titulación con TNBS (%)
OC-CALB	100 ± 3
OC-CALB-EDA	200 ± 15
OC-CALB-EDA-PEG	110 ± 5

4.5.2.1 Caracterización electroforética de los derivados de OC-CALB modificados con EDA y Mpeg. Los derivados OC-CALB, OC-CALB-EDA y OC-CALB-EDA-PEG fueron caracterizados mediante estudios electroforéticos en condiciones desnaturalizantes y no-desnaturalizantes.

La **figura 43a**, muestra la electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se observa que la introducción de las cadenas poliméricas de mPEG ocasionó una ligera alteración en la movilidad electroforética de OC-CALB-EDA-PEG producto probablemente del tamaño de las cadenas poliméricas introducidas que incrementaron levemente el peso molecular de la enzima en comparación con los derivados OC-CALB y OC-CALB-EDA.

La **Figura 43b**, muestra la caracterización electroforética de los derivados OC-CALB, OC-CALB-EDA y OC-CALB-EDA-PEG en condiciones no-desnaturalizantes (PAGE-Nativa). Se observa que la modificación química con PEG ocasionó un ensanchamiento de la banda correspondiente al derivado OC-CALB-EDA-PEG. Por lo tanto, es posible que la introducción de las cadenas poliméricas de PEG sobre la superficie enzimática del derivado OC-CALB-EDA haya ocasionado problemas de difusión en la migración de la enzima a lo largo de la corrida electroforética.

Figura 43. Efecto de la modificación en fase sólida de CALB con PEG sobre la movilidad electroforetica de la enzima. A) Electroforesis SDS-Page. B) Electroforesis Page-nativa de las diferentes preparaciones de CALB. Los experimentos fueron realizados de acuerdo a lo descrito en el capítulo 2, sección 4.3. Carril P: marcador de peso molecular; Carril 1: OC-CALB; Carril 2: OC-CALB-EDA; Carril 3: OC-CALB-EDA-PEG.



4.5.3 Efecto de la modificación del derivado OC-CALB con EDA y mPEG sobre la actividad enzimática frente al p-NPB. La actividad enzimática de los derivados OC-CALB, OC-CALB-EDA y OC-CALB-EDA-PEG fue evaluada en la hidrólisis del p-NPB, 0.4 mM a pH 7, de acuerdo con lo descrito en la sección de métodos analíticos, numeral 4.1.

La **tabla 17**, muestra que el derivado OC-CALB-EDA-PEG fue 60% más activo que el derivado no modificado OC-CALB en la hidrólisis del p-NPB. Es posible que el notable incremento en la actividad catalítica, se deba a que el aumento de la hidrofobicidad de la superficie proteica de CALB reduce la densidad de carga positiva, y con ello las interacciones repulsivas ocasionadas en un principio por el proceso de aminación. Además, la introducción de las cadenas de PEG sobre la

superficie proteica de CALB estarían generando nuevas interacciones hidrofóbicas con residuos aminoacídicos cercanos al bolsillo hidrofóbico, ocasionando el desplazamiento del lid, y con ello cambiando la forma exacta del centro activo (Schrag y col., 1997; Rotticci y col., 2001; Gutierrez y col., 2007).

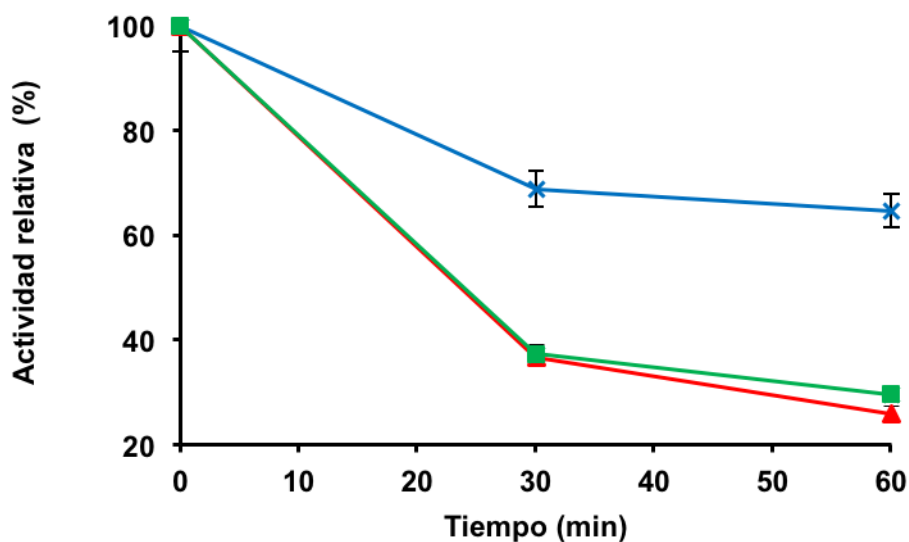
Tabla 17. Actividad enzimática de los derivados de OC-CALB modificados con EDA y PEG en la hidrólisis de p-NPB, 0.4 mM a pH 7. El 100% corresponde a la actividad del derivado no modificado OC-CALB. Los experimentos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos analíticos, numeral 4.1.

Derivado	Actividad relativa (%)
OC-CALB	100 ± 3
OC-CALB-EDA	111 ± 5
OC-CALB-EDA-PEG	160 ± 10

4.5.4 Efecto de la modificación de OC-CALB con EDA y mPEG en la estabilidad térmica y frente a THF. La estabilidad térmica de los derivados OC-CALB, OC-CALB-EDA y OC-CALB-EDA-PEG fue evaluada a 70°C, de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 3.4.1.

En la **figura 44**, se observa el perfil de inactivación térmica a 70°C de los derivados modificados de OC-CALB. Se puede observar que trascurridos 60 minutos de incubación, los derivados OC-CALB-EDA y OC-CALB-EDA-PEG fueron 70% y 75% menos estables, respectivamente, que el derivado no modificado OC-CALB. Esto sugiere, que las modificaciones realizadas sobre la superficie proteica de la CALB con EDA y mPEG ocasionaron un cambio conformacional desfavorable en la estructura 3D, causado posiblemente por la ruptura de interacciones electrostáticas atractivas importantes para la estabilidad de la CALB.

Figura 44. Cursos de inactivación térmica de los derivados de OC-CALB modificados con EDA y PEG. La inactivación térmica se realizó a pH 7 y 70°C, usando como sustrato p-NPB (0.4 mM) para determinar la actividad residual. (X) Octil-CALB, (■) Octil-CALB-EDA, (▲) Octil-CALB-EDA-PEG.

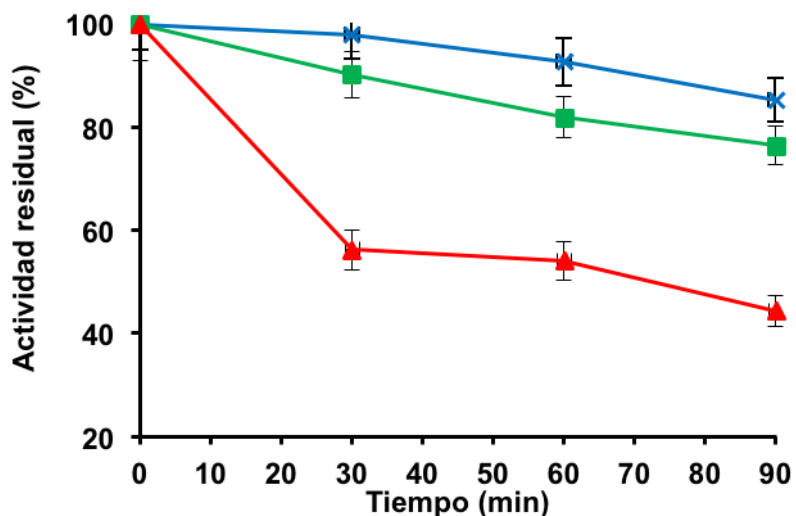


La estabilidad de los derivados OC-CALB, OC-CALB-EDA y OC-CAL-EDA-PEG fue evaluada en presencia de una solución de THF (50% v/v) / buffer Tris-HCl 50mM a pH 7 a 40°C de acuerdo a lo descrito en el numeral 3.4.2. La **figura 45**, muestra que transcurridos 90 minutos de incubación, los derivados OC-CALB-EDA y OC-CALB-EDA-PEG fueron 10% y 55% menos estables respectivamente, que el derivado OC-CALB.

Las diferencias encontradas en la estabilidad de los derivados OC-CALB-EDA y OC-CALB-EDA-PEG se deben posiblemente a los cambios conformacionales que sufre la estructura 3D de la enzima como consecuencia de las modificaciones químicas con EDA y PEG. La mayor estabilidad del derivado OC-CALB-EDA en comparación con el derivado OC-CALB-EDA-PEG se debe posiblemente a que los grupos amino introducidos por la modificación con EDA, generaron nuevas interacciones de tipo puente de hidrógeno entre la enzima y el THF. Mientras que

en el derivado OC-CALB-EDA-PEG, este efecto estabilizante disminuye por la introducción de las cadenas de PEG. Además, es interesante que a pesar de la introducción de aproximadamente 15 grupos PEG por molécula de la CALB, las cadenas poliméricas no generen un efecto de reparto del THF disminuyendo la concentración efectiva del mismo en el entorno de las moléculas de la enzima inmovilizada (Fernández-Lafuente y col., 1998; Wilson y col., 2004).

Figura 45. Cursos de inactivación de los derivados de OC-CALB modificados con EDA y PEG, incubados en THF (50% v/v) / buffer Tris-HCl 50mM a pH 7 a 40°C, usando como sustrato p-NPB (0.4 mM) para determinar la actividad residual. (X) Octil-CALB, (■) Octil-CALB-EDA, (▲) Octil-CALB-EDA-PEG.



4.5.5 Influencia de la naturaleza del soporte de inmovilización sobre el efecto final de la modificación de CALB con EDA y PEG. Se estudió la influencia de la naturaleza del soporte y la orientación de la enzima sobre el mismo sobre el efecto final de la modificación de CALB con EDA y PEG. Para ello, la CALB fue inmovilizada covalentemente sobre el soporte comercial Eupergit C (EC) y modificada masivamente con grupos aminos y PEG. Posteriormente, se evaluó la actividad y enantioselectividad de los derivados frente en la transesterificación del (R/S)-mandelato de metilo, (R/S)-propranolol y (R/S)-atenolol.

4.5.5.1 Inmovilización covalente de CALB sobre el soporte Eupergit C (EC).

La CALB fue inmovilizada de forma covalente sobre el soporte EC, de acuerdo a las condiciones descritas en el numeral 3.1.1 (Wheatley y col., 1996). Los resultados obtenidos señalan que trascurridas 48 horas, se inmovilizó cerca del 50% de CALB, manteniendo alrededor del 90% de la actividad inicial ofrecida al soporte. El derivado de CALB obtenido por el proceso de inmovilización se llamo EC-CALB.

El derivado EC-CALB, fue incubado en una solución acuosa de triton X-100 al 1%(v/v) por 48 horas. Posteriormente se filtró y se lavó con agua destilada. Este tratamiento desorbió del soporte un 25 % de la enzima inmovilizada a través de adsorción hidrofóbica y permitió disponer solo de la enzima inmovilizada covalentemente (1mg de proteína por gramo de soporte).

Finalmente, el derivado EC-CALB fue modificado masivamente con EDA y posteriormente con PEG bajo las condiciones experimentales determinadas con el derivado OC-CALB, descritas en el numeral 3.2.2. Las preparaciones de CALB obtenidas por modificación con EDA y PEG fueron nombradas EC-CALB-EDA y EC-CALB-EDA-PEG, respectivamente.

4.5.5.2 Hidrólisis enantioselectiva del (R/S) mandelato de metilo catalizada por lo derivados OC-CALB-EDA, OC-CALB-EDA-PEG y EC-CALB-EDA, EC-CALB-EDA-PEG. La **tabla 18**, muestra los resultados obtenidos en las reacciones de hidrólisis del R y S-mandelato de metilo catalizadas por los derivados de la CALB inmovilizados sobre los soportes Octil-agarosa (OC) y Eupergit C (EC) (ver numeral 3.5.1).

Se observó que los derivados EC-CALB, fueron en promedio 2 veces más activos que los derivados OC-CALB. Este comportamiento contrasta con los resultados de actividad obtenidos en la hidrólisis del pNPB, donde los derivados OC-CALB

fueron más activos que los EC-CALB. Por tanto, es notable el cambio en la especificidad de la enzima, como consecuencia del protocolo de inmovilización utilizado (Mateo y Col., 2007; Hernandez y Fernández-Lafuente, 2011).

Se observó que los derivados OC-CALB-EDA y OC-CALB-EDA-PEG exhibieron actividades diferentes en la hidrólisis de R-mandelato de metilo (**tabla 18**). Por ejemplo, la aminación del derivado OC-CALB ocasionó un incremento en la actividad del nuevo derivado OC-CALB-EDA del 5%. La introducción de grupos PEG sobre el derivado OC-CALB-EDA ocasionó una disminución de la actividad del 49% en comparación con el derivado no modificado OC-CALB.

El efecto de la modificación de CALB con EDA y PEG fue totalmente diferente cuando se utilizó la enzima inmovilizada covalentemente sobre Eupergit C. Los derivados EC-CALB-EDA y EC-CALB-EDA-PEG fueron 2.3 veces menos activos en la hidrólisis de R-mandelato de metilo que el derivado no modificado EC-CALB. Las grandes diferencias encontradas en las actividades de los diferentes derivados de OC-CALB y EC-CALB se deben posiblemente a los cambios conformacionales que sufre la enzima por las modificaciones con EDA y PEG, que afectan la movilidad de las áreas cercanas al centro activo de la lipasa.

Para el caso particular del derivado OC-CALB, los cambios conformacionales que sufre pueden ser menos drásticos debido a que la enzima tiene la estructura abierta estabilizada en el soporte (Bastida y Col., 1998; Carrasco y Col., 2009; Rodrigues y col., 2012). Caso contrario ocurre con el derivado EC-CALB, en donde la inmovilización covalente se da a través de zonas que pueden estar lejanas al centro activo y al lid, lo cual hace que los procesos de modificación puedan perturbar fuertemente las interacciones que mantienen el lid alejado del sitio activo de la enzima (Schrag y col., 1997; Rotticci y col., 2001; Gutierrez y col., 2007).

La enantioselectividad (E) de los derivados modificados de OC-CALB y EC-CALB fue evaluada en la hidrólisis del (R/S)-Mandelato de metilo de acuerdo a las condiciones experimentales descritas en el numeral 3.5.1. Los resultados obtenidos (**tabla 18e**) muestran que los derivados OC-CALB-EDA y OC-CALB-EDA-PEG, fueron 2% más enantioselectivos que el derivado OC-CALB en la hidrólisis del (R/S)-mandelato de metilo. El incremento en el valor E, fue más notorio en los derivados EC-CALB-EDA y EC-CALB-EDA-PEG, los cuales aumentaron su enantioselectividad en un factor de 2.2 y 2.7 veces, respectivamente. Estos resultados confirman que el uso de diferentes protocolos de inmovilización altera completamente el efecto final de la modificación química de una enzima.

Tabla 18. Actividad y enantioselectividad (E) de los diferentes derivados de CALB inmovilizados en Octil-agarosa y Eupergit C. Los experimentos fueron realizados de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos analíticos, capítulo 1, sección 3.5. ^a La actividad específica se definió como $\mu\text{mol/mg}$ de proteína inmovilizada/min. ^b El valor E se determinó como la razón: Actividad frente a R-mandelato de metilo / Actividad frente a S-metil mandelato.

Biocatalizador	Octil-agarosa (OC)		Eupergit C (EC)	
	Actividad ^a (U/mg)	E ^b	Actividad ^a (U/mg)	E ^b
CALB	10.2 ± 1	15.8 ± 1	21.2 ± 1.4	7.5 ± 0.7
CALB-EDA	10.8 ± 1	16.2 ± 1.2	9.4 ± 0.8	16.6 ± 1
CALB-EDA-PEG	5.2 ± 0.7	16.4 ± 1	9.3 ± 0.8	20 ± 1.2

4.5.6 Transesterificación enantioselectiva del (R/S) propanolol y (R/S)-atenolol catalizada por lo derivados de EC-CALB aminados y PEGilados. Se evaluó la actividad y enantioselectividad de los derivados EC-CALB, EC-CALB, EC-CALB-EDA y EC-CALB-EDA-PEG en la trans-esterificación enantioselectiva

de (R/S)-propanolol y (R/S)-atenolol, interesantes aminoalcoholes para la industria farmacéutica (Avila y col., 2005; Egholm y Col., 2005).

Los derivados de OC-CALB modificados con EDA y PEG no fueron utilizados para catalizar las reacciones debido a que la unión de la enzima al soporte es reversible y bajo las condiciones de reacción (medios anhidros), la enzima puede desorberse del mismo.

4.5.6.1 Transesterificación enzimática de (R/S)-Atenolol. La actividad y enantioselectividad de los derivados derivados EC-CALB, EC-CALB, EC-CALB-EDA y EC-CALB-EDA-PEG fue evaluada catalizando la reacción de transesterificación de (R/S)-Atenolol, en un rango comprendido entre el 15 y 20% de conversión y analizada por HPLC quiral, de acuerdo a lo descrito en los numerales 3.5.2 y 4.4.

Los resultados obtenidos (**Tabla 19**), muestran que el derivado EC-CALB-EDA fue 25% menos activo que el derivado EC-CALB en la trans-esterificación del (R/S)-atenolol. La introducción de cadenas poliméricas de PEG sobre la superficie proteica del derivado OC-CALB-EDA no ocasionó un efecto significativo sobre la actividad de síntesis del derivado EC-CALB-EDA-PEG en comparación con el derivado no modificado.

Los derivados EC-CALB-EDA y EC-CALB-EDA-PEG exhibieron diferentes valores de enantioselectividad en la transesterificación de (R/S)-atenolol. Por ejemplo, el derivado EC-CALB-EDA fue 2.9 veces menos enantioselectivo que el derivado no modificado EC-CALB, mientras que el derivado EC-CALB-EDA-PEG fue 1.2 veces más enantioselectivo que el derivado EC-CALB-EDA.

Las diferencias en la actividad y enantioselectividad de los derivados EC-CALB-EDA y EC-CALB-EDA-PEG en la transesterificación de (R/S)-atenolol se deben

posiblemente a que las modificaciones químicas con EDA y PEG ocasionaron probablemente cambio conformacional en la estructura 3D de la CALB, alterando con ello la forma exacta del centro activo de la enzima.

Tabla 19. Actividad y enantioselectividad de los derivados EC-CALB modificados con EDA y PEG, en la transesterificación de (R/S)-Atenolol. Los experimentos fueron realizados de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales (sección 3.5.2).

Derivado	Enantiopreferencia	Actividad específica (U/g)	ee _p (%)	E
EC-CALB	R	0.88 ± 0.07	96	65 ± 0.1
EC-CALB-EDA	R	0.66 ± 0.05	90.3	22.8 ± 0.3
EC-CALB-EDA-PEG	R	0.66 ± 0.04	94.3	39.8 ± 0.2

Condiciones de reacción: Atenolol (0.05 mmol), acetato de vinilo (0.15 mmol), derivado (50 mg) y tolueno (hasta completar un volumen total de 3 ml).

4.5.6.2 Transesterificación enzimática de (R/S)-propanolol. La actividad y enantioselectividad de los derivados EC-CALB, EC-CALB-EDA y EC-CALB-EDA-PEG fue evaluada en la transesterificación del (R/S)-propanolol en un rango comprendido entre el 15% y 20% de conversión, de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales (sección 3.5.2).

La **tabla 20** muestra que la introducción de grupos amino sobre la superficie proteica de la CALB produjo una disminución dramática en la actividad del derivado EC-CALB-EDA, el cual fue 80% menos activo en comparación con el derivado EC-CALB. La modificación del derivado EC-CALB-EDA con PEG, ocasionó una disminución (33.3%) en la actividad del derivado EC-CALB-

EDA-PEG catalizando la reacción de transesterificación del (R/S)-propanolol, en comparación con el derivado no modificado EC-CALB.

La enantioselectividad exhibida por los derivados EC-CALB-EDA y EC-CALB-EDA-PEG en la reacción de transesterificación de (R/S)-propanolol disminuyó considerablemente en comparación con el derivado no modificado EC-CALB. Así, el derivado EC-CALB-EDA fue 6.6 veces menos enantioselectivo que el derivado EC-CALB. El derivado EC-CALB-EDA-PEG fue 7.3 veces menos enantioselectivo que el derivado no modificado EC-CALB.

Tabla 20. Actividad y enantioselectividad de los derivados EC-CALB modificados con EDA y PEG, en la transesterificación de (R/S)-Propanolol. Los experimentos fueron realizados de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales (sección 3.5.2).

Derivado	Enantiopreferencia	Actividad específica (U/g)	ee _p (%)	E
EC-CALB	R	0.60 ± 0.5	96	57 ± 0.2
EC-CALB-EDA	R	0.49 ± 0.4	77.4	8.6 ± 0.3
EC-CALB-EDA-PEG	R	0.40 ± 0.4	78.3	7.8 ± 0.3

Los resultados de actividad y enantioselectividad obtenidos para los derivados EC-CALB-EDA y EC-CALB-EDA-PEG catalizando las reacciones de transesterificación de (R/S)-atenolol y (R/S)-propanolol, sugieren que el efecto final de la modificación química sobre las propiedades biocatalíticas de la enzima puede ser diferente tan solo cambiando la estructura del sustrato. Un claro ejemplo de ello, son las diferencias en la enantioselectividad mostrada por el derivado EC-CALB-EDA-PEG frente al (R/S)-atenolol (E=39.8) y (R/S)-propanolol (E=7.8).

4.6 CONCLUSIONES

- La modificación de la superficie proteica de CALB con m-PEG succínico no se produjo fácilmente bajo las condiciones descritas en la literatura (Godoy y Col., 2012). Sin embargo, la modificación previa de la enzima en fase sólida con EDA, permitió el diseño de un protocolo de modificación de CALB con PEG más eficiente, a través de la introducción de grupos amino más reactivos, que facilitan la posterior reacción con el grupo carbonilo de las cadenas poliméricas de m-PEG-succinato.
- Las modificaciones de CALB inmovilizada en Octil-agarosa con EDA y PEG, ocasionaron una drástica disminución en la estabilidad térmica (70°C) de la enzima. Trascurridos 60 minutos de incubación, los derivados OC-CALB-EDA y OC-CALB-EDA-PEG fueron 70% y 75%, menos estables respectivamente, que el derivado no modificado OC-CALB.
- El efecto final de las modificaciones químicas de CALB con EDA y PEG sobre las propiedades biocatalíticas de la enzima, es significativamente dependiente de la naturaleza del soporte y del protocolo de inmovilización utilizado. Por ejemplo, la modificación de CALB inmovilizada en Octil-agarosa (OC-CALB) con EDA, ocasionó leves incrementos en su actividad (de 10. U/mg a 10.8 U/mg) y enantioselectividad (de $E= 15.8$ a $E=16.2$) en la hidrólisis del R/S-mandelato de metilo. Sin embargo, esta misma modificación sobre el derivado de CALB previamente inmovilizado en Eupergit C (EC-CALB), produjo una drástica caída en la actividad del derivado (de 21.2 U/mg a 9.4 U/mg) y un notable incremento en la enantioselectividad (de $E= 7.5$ a $E= 16.6$) en la hidrólisis del R/S-mandelato.
- La modificación de los derivados OC-CALB-EDA y EC-CALB-EDA con m-PEG succínico, produjo un cambio en la especificidad de la enzima. En ambos

derivados la introducción de cadenas poliméricas de polietilenglicol ocasionaron un incremento de la actividad enzimática en la hidrólisis del p-NPB. Mientras que en la hidrólisis del R-Mandelato de metilo, la actividad de estos mismos derivados modificados fue claramente inferior con respecto a la enzima no modificada (para OC-CALB de 10.2 U/mg a 5.2 U/mg y para EC-CALB de 21.2 U/mg a 9.3 U/mg).

- El efecto final de la modificación química sobre las propiedades biocatalíticas de CALB es diferente al cambiar la estructura del sustrato. Por ejemplo, la modificación química por aminación, y PEGilación del derivado de CALB inmovilizado sobre Eupergit C (EC-CALB-EDA y EC-CALB-EDA-PEG) produjo una alteración en los valores de enantioselectividad en la reacción de transesterificación de los amino alcoholes, propanolol ($E=8.6$ y $E=7.8$) y atenolol ($E=22.8$ y $E=39.8$).

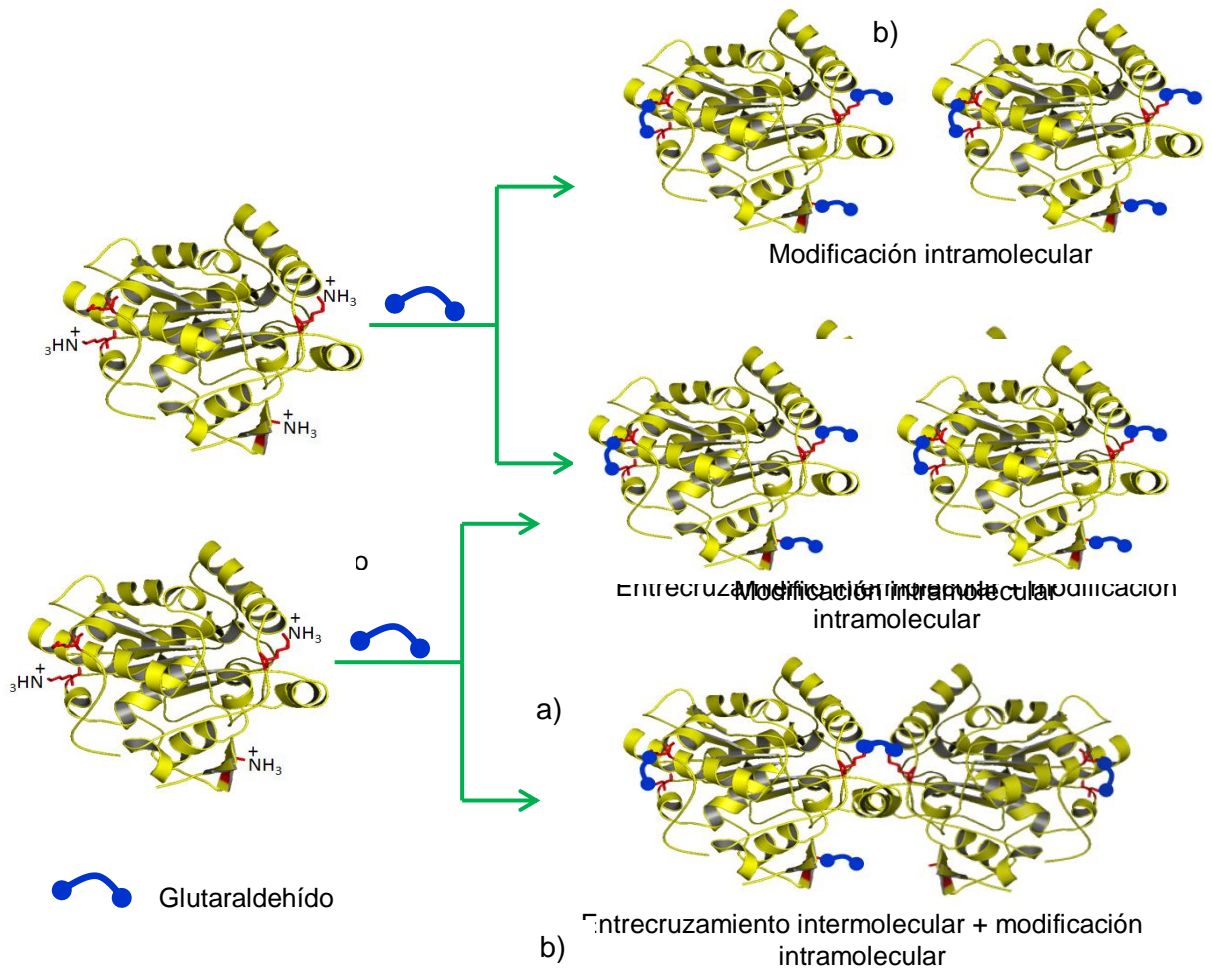
5. MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOCATALÍTICAS DE CALB MEDIANTE ENTRECruzAMIENTO INTER E INTRAMOLECULAR CON GLUTARALDEHÍDO

5.1 INTRODUCCIÓN

El glutaraldehído es uno de los agentes químicos más utilizados para la modificación de la superficie proteica de enzimas, debido a que puede reaccionar con diferentes grupos funcionales presentes en las proteínas (grupos amino, tiol, fenol e imidazol). Se ha descrito en la literatura que es altamente selectivo hacia los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina debido a la naturaleza nucleofílica de estos últimos (Migneault y Col., 2004).

La selectividad mostrada por el glutaraldehído hacia los residuos de lisina lo hace un efectivo agente entrecruzante de proteínas, a través de un mecanismo de reacción que aún se encuentra en discusión (Migneault y Col., 2004). En general, el tratamiento de proteínas con glutaraldehído puede generar entrecruzamientos intermoleculares e intramoleculares. El tipo de entrecruzamiento generado depende de la posición espacial de los residuos de lisina en la estructura 3D de la proteína y la proximidad entre las moléculas proteicas. Por ejemplo, el entrecruzamiento intramolecular se da solo cuando las posiciones espaciales y los radios de van der Waals de los grupos involucrados localizados sobre la superficie proteica de la enzima coinciden con los del agente entrecruzante (**Figura 46a**). Mientras el entrecruzamiento intermolecular se da a través de la modificación completa de los grupos ϵ -amino de la proteína facilitando la reacción entre moléculas de proteína próximas entre sí (**figura 46b**) (Torchilin y Col., 1979; Rodrigues y Col., 2011).

Figura 46. Modificación y entrecruzamiento de enzimas con glutaraldehído.



La concentración de glutaraldehído, el valor del pH y el tiempo de reacción permiten controlar el grado de modificación de los grupos amino primarios de la enzima (Monsan, 1978). Se ha descrito que la reactividad del glutaraldehído es dependiente del valor de pH del medio de reacción. A valores de pH ácido y neutro el glutaraldehído se encuentra mayoritariamente en su forma monomérica que le permite ser altamente reactivo hacia grupos amino primarios. Sin embargo, el incremento del valor de pH ($\text{pH} \geq 8$) ocasiona la dimerización del glutaraldehído y con ello la disminución de la reactividad frente a los residuos lisínicos (Migneault y Col., 2004; López-Gallego y Col., 2005; Betancor y Col., 2006).

El entrecruzamiento intermolecular e intramolecular de enzimas con glutaraldehído puede ocasionar un cierto incremento en la rigidez de las zonas de la superficie proteica involucradas en la formación del enlace covalente (Wong y Col., 1992). Además, la modificación química con glutaraldehído añade un grupo relativamente hidrofóbico a los grupos amino de la enzima, lo que puede afectar significativamente la naturaleza química de la superficie proteica (por ejemplo, la hidrofobicidad), alterando las propiedades biocatalíticas de la enzima.

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, se modificó parcial y masivamente la superficie enzimática del derivado OC-CALB con glutaraldehído con el fin de estudiar los efectos del entrecruzamiento intermolecular e intramolecular sobre las propiedades funcionales de la enzima (actividad, estabilidad) bajo diferentes condiciones experimentales. Además, se estudió el mecanismo de adsorción y distribución de la enzima sobre la superficie porosa del soporte Octil-agarosa y su influencia sobre entrecruzamiento intermolecular e intramolecular.

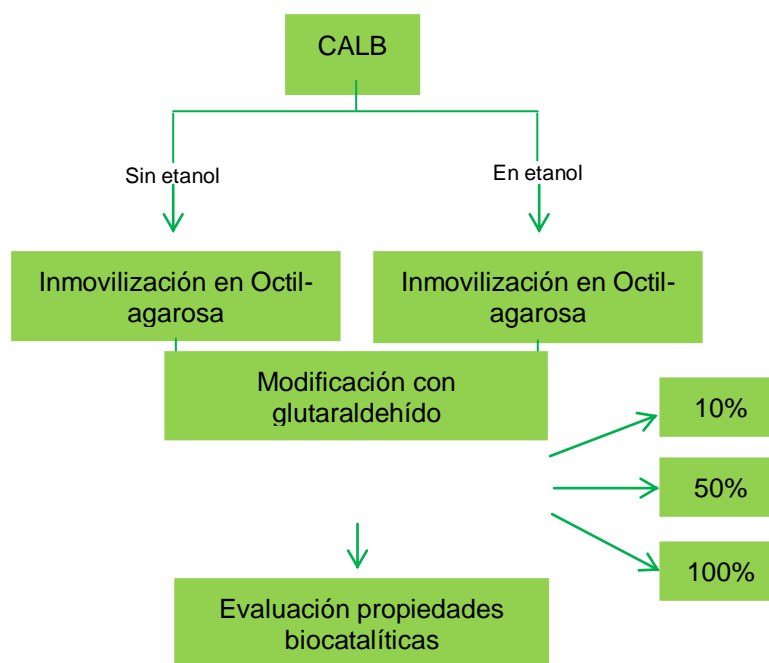
5.2 MATERIALES

La lipasa B de *Candida antarctica* (CAL-B) fue obtenida de Novozymes (Parana, Brasil). El Octil agarosa 4BCL, Tritón X-100, p-nitrofenilbutirato (pNPB), el ácido picril sulfónico (TNBS), glutaraldehído (50% v/v), Borohidruro de Sodio (NaBH_4) fueron obtenidos de Sigma Aldrich (St. Louis, Mo, USA). Los marcadores de peso molecular de proteínas para electroforesis de proteínas 1D se obtuvieron de Fermentas. Los reactivos utilizados en la síntesis y en las reacciones fueron todos de grado analítico y suministrado por Sigma Aldrich.

5.3 MÉTODOS EXPERIMENTALES

La CALB fue inicialmente inmovilizada sobre Octil-agarosa a baja fuerza iónica a través de dos estrategias: 1) En ausencia de etanol; 2) en presencia de concentraciones de etanol al 10%, 20%, 30%, 40% y 50% (v/v). Una vez obtenido los derivados de CALB, se realizaron modificaciones parciales y masivas de la superficie enzimática con glutaraldehído. Para ello, se estandarizaron las condiciones experimentales que permitieron modificar el 25%, 50% y el 100% de los grupos amino expuestos. Finalmente, se evaluó el efecto del entrecruzamiento intermolecular e intramolecular sobre las propiedades biocatalíticas (actividad y estabilidad) de los derivados de CALB (**figura 47**).

Figura 47. Metodología general realizada para la modificación de la CALB con glutaraldehído.



5.3.1 Inmovilización de CALB por adsorción hidrofóbica sobre Octil-agarosa (OC).

5.3.1.1 Inmovilización de CALB en Octil-agarosa (Bastidas y col., 1998). Dos ml del extracto comercial de CALB, con una concentración de proteína de 5.9 mg/ml y una actividad específica de 21 U/mg, fueron diluidos en 98 ml de buffer fosfato de Sodio 5 mM de pH 7. A continuación, se adicionaron 20 gramos secos de soporte Octil-agarosa. Periódicamente, se evaluó el proceso de inmovilización de CALB sobre el soporte, midiendo la actividad residual de la suspensión y el sobrenadante en la hidrólisis del p-NPB (Ver numeral 4.1). Después de 3 horas a 4 °C, bajo agitación constante a 250 rpm, la suspensión de inmovilización fue filtrada y la lipasa inmovilizada fue lavada 3 veces con agua destilada y buffer fosfato de sodio 25 mM de pH 7. El derivado fue llamado OC-CALB-C.

5.3.1.2 Inmovilización de CALB en Octil-agarosa en presencia de etanol. Dos ml del extracto comercial de CALB, con una concentración de proteína de 5.9 mg/ml y una actividad específica de 21 U/mg, fueron diluidos en 98 ml de buffer fosfato de Sodio 5 mM de pH 7 que contenía etanol al 10%, 20%, 30%, 40% y 50% (v/v). A continuación, se adicionaron 20 gramos secos de soporte Octil-agarosa. Periódicamente, se evaluó el proceso de inmovilización de CALB sobre el soporte, midiendo la actividad residual de la suspensión y el sobrenadante en la hidrólisis del p-NPB (Ver numeral 4.1). Después de 3 horas a 4 °C, bajo agitación constante a 250 rpm, la suspensión de inmovilización fue filtrada y la lipasa inmovilizada fue lavada 3 veces con agua destilada y buffer fosfato de sodio 25 mM de pH 7. El derivado fue llamado OC-CALB-E.

5.3.2 Modificación parcial y masiva de los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído. Las condiciones experimentales de modificación de OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído fueron estandarizadas (pH, concentración de glutaraldehído y tiempo de reacción) con el fin de obtener

modificaciones parciales del 25% y 50% de los residuos de lisina presentes en la superficie enzimática. La modificación masiva (100% de modificación) de los derivados de CALB se realizó de acuerdo a lo descrito por Fernandez-Lafuente y Col., 1995, Palomo y Col., 2007.

5.3.2.1 Modificación del 25% de los residuos lisínicos de los derivados OCC-CALB y OCE-CALB con glutaraldehído. Un gramo de derivado OC-CALB fue incubado en 10 ml de tampón fosfato de sodio, 25 mM a pH 6. A continuación, se adicionaron 20 μ L de glutaraldehído (50 %v/v) para obtener una concentración final de 0.1% v/v. Transcurridos 30 minutos de reacción, el derivado OCC-CALB fue filtrado, lavado con agua, y re-suspendido en 10 ml de disolución que contenía tampón bicarbonato de Sodio, 100 mM, pH 9, y NaBH₄, 1 mg/mL. Después de 30 minutos a 4 °C, el derivado fue nuevamente filtrado y lavado varias veces con tampón fosfato de Sodio, 25 mM de pH 7, hasta eliminar el exceso NaBH₄. El grado de modificación del derivado OC-CALB-C fue determinado a través de la titulación de los grupos amino con TNBS de acuerdo a lo descrito en el numeral 4.2. El derivado obtenido se llamó OC-CALB-C-Glu-25%.

El procedimiento fue replicado para el derivado OC-CALB-E y el derivado obtenido se nombró OC-CALB-E-GLU-25%.

5.3.2.2 Modificación del 50% de los residuos de lisina de los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído. La modificación del 50% de los residuos lisínicos de OC-CALB-C se realizó de forma similar a lo descrito en el numeral 3.2.1, con la excepción que el valor del pH del medio de reacción fue 7 y el tiempo de reacción fue de 1 hora. El derivado obtenido se llamó OC-CALB-C-Glu-50%. El procedimiento fue replicado para el derivado OC-CALB-E y el derivado obtenido se nombró OC-CALB-E-GLU-50%.

5.3.2.3 Modificación masiva de OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído (Fernández-Lafuente y Col., 1995). Un gramo de derivado OC-CALB-C fue incubado en 10 ml de tampón fosfato de sodio, 25 mM a pH 7. A continuación, se adicionaron 100 μ L de glutaraldehído (50 %v/v) para obtener una concentración final de 0,5% v/v. Trascurridos 60 minutos de reacción, el derivado OC-CALB-C fue filtrado, lavado con agua, y re-suspendido en 10 ml de disolución que contenía tampón bicarbonato de Sodio, 100 mM, pH 10, y NaBH₄, 1 mg/mL. Después de 30 minutos a 4°C, el derivado fue nuevamente filtrado y lavado múltiples veces con tampón fosfato de Sodio, 25 mM de pH 7, hasta eliminar el exceso NaBH₄. El grado de modificación del derivado OC-CALB-C fue determinado a través de la titulación de los grupos amino con TNBS de acuerdo a lo descrito en el numeral 4.2. El derivado obtenido se llamó OC-CALB-C-Glu-100%.

El procedimiento fue replicado para el derivado OC-CALB-E y el derivado obtenido se nombró OC-CALB-E-GLU-100%.

5.3.3 Efecto del pH sobre la Actividad enzimática de los derivados OCC-CALB y OCE-CALB modificados con glutaraldehído frente a la hidrólisis de p-nitrofenil-butirato (p-NPB). El efecto del pH sobre la actividad enzimática de los derivados OC-CALB-C-GLU-25%, OC-CALB-C-GLU-50%, OC-CALB-C-GLU-100%, OC-CALB-E, OC-CALB-E-GLU-25%, OC-CALB-E-GLU-50% y OCE-CALB-E-GLU-100% fue evaluado de forma similar al protocolo descrito en la sección 4.2, para la determinación de actividad usando como sustrato p-NPB, con la excepción que la solución buffer de medida fue reemplazada por: acetato de sodio a pH 5 y pH 6; fosfato de sodio a pH 7 y pH 8 y borato de sodio a pH 9 y pH 10.

5.3.4 Evaluación de la estabilidad de los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E modificados con glutaraldehído al 25%, 50% y 100%

5.3.4.1 Estabilidad térmica. Las estabilidades térmicas de los derivados OC-CALB-C, OC-CALB-C-GLU-25%, OC-CALB-C-GLU-50%, OC-CALB-C-GLU-100%, OC-CALB-E, OC-CALB-E-GLU-25%, OC-CALB-E-GLU-50% y OCE-CALB-E-GLU-100% fueron evaluadas a 60 °C. Para ello, un gramo de derivado de CALB, fue suspendido en 10 ml de buffer de acetato de sodio 50 mM, pH 5 e incubado a 60°C. Periódicamente se extrajeron 100 µL de suspensión y se determinó la actividad residual usando como sustrato p-NPB de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos analíticos, numeral 4.2. Todas las medidas se realizaron por triplicado y los errores experimentales siempre fueron menores al 10%.

El procedimiento fue repetido, incubando los derivados de CALB en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7 a 60 °C y en buffer borato de sodio 50mM de pH 9 a 50 °C.

5.3.4.2 Estabilidad en presencia de dimetil-sulfóxido (DMSO). Un gramo de derivado OC-CALB-C fue incubado a 45°C en una mezcla de 50% (v/v) de DMSO/ buffer Tris-HCl 100mM a pH 7. Periódicamente, se extrajeron 100 µL de suspensión y se evaluó la actividad residual usando como sustrato p-NPB de acuerdo a lo descrito en la **sección 4.2**. La presencia de cantidades inferiores a 50 µL de cosolvente orgánico no afectó la velocidad de reacción enzimática observada en el ensayo de hidrólisis de p-NPB.

El procedimiento fue replicado para los derivados OC-CALB-C-GLU-25%, OC-CALB-C-GLU-50%, OC-CALB-C-GLU-100%, OC-CALB-E, OC-CALB-E-GLU-25%, OC-CALB-E-GLU-50% y OCE-CALB-E-GLU-100%.

5.3.5 Desorción de CALB del soporte Octil-agarosa. Un gramo de derivado OC-CALB-C fue suspendido en 15 mL de buffer fosfato de Sodio 10 mM de pH 7 y de manera progresiva se adicionó tritón X-100 hasta obtener una concentración final de 1.5 % (v/v). Cada adición de tritón se realizó a intervalos de 30 minutos, tiempo durante el cual se extraían 100 μ L de suspensión y de sobrenadante y se determinaba la actividad enzimática frente a p-NPB de acuerdo a lo descrito en el numeral 4.2.

Para contrarrestar los efectos del detergente sobre la actividad enzimática se utilizó como blanco de referencia, agarosa inerte y la misma cantidad de lipasa que fue usada en el tratamiento cuando se adsorbió sobre Octil-agarosa.

El procedimiento fue reproducido con los derivados OC-CALB-C-GLU-25%, OC-CALB-C-GLU-50%, OC-CALB-C-GLU-100%, OC-CALB-E, OC-CALB-E-GLU-25%, OC-CALB-E-GLU-50% y OC-CALB-E-GLU-100%.

5.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.4.1 Determinación estándar de la actividad enzimática frente al p-nitrofenilbutirato (p-NPB). La actividad catalítica de CALB se cuantificó de forma continua a través del método de velocidades iniciales de reacción. El ensayo se llevó a cabo midiendo el aumento en el valor de absorbancia a 348 nm, producido por la formación del producto p-nitrofenol (coeficiente de extinción molar= 5150 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) generado por la hidrólisis de p-NPB 0.4 mM, disuelto en tampón fosfato sódico 25 mM, pH 7 a 25 °C. Para iniciar la reacción, 100 μ L de solución lipásica se añadieron a 2,5 mL del sustrato. Una unidad internacional de actividad enzimática fue definida como la cantidad de lipasa que es necesaria para hidrolizar 1 μ mol de p-NPB por minuto (IU) bajo las condiciones descritas anteriormente.

5.4.2 Determinación del grado de modificación de los grupos amino de CALB. El grado de modificación de los grupos amino fue determinado mediante la titulación de los grupos aminos primarios usando la metodología del ácido picril sulfónico (Snyder y col., 1975; Montes y col., 2006;). A 350 mg derivado enzimático de CALB modificado, se adicionaron 3 mL de solución de ácido picril sulfónico o TNBS 0.1% (p/v) a pH 8. Después de 30 minutos de reacción a temperatura ambiente, el derivado se lavó con agua destilada. 200 mg se resuspendieron en 2.1 mL de borato de sodio 1M pH 9 y la medición de absorbancia se llevó a cabo a 430nm. Se usó como blanco de reacción el soporte octil-agarosa.

5.4.3 Estudios electroforéticos de los derivados modificados de CALB

5.4.3.1 Electroforesis en condiciones desnaturizantes. En la electroforesis en condiciones desnaturizantes o SDS-PAGE (Laemmli 1970), se utilizó el buffer de ruptura (Tris-HCl 62,5 mM pH 6.8, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanol, 5% glicerol) y geles de poliacrilamida al 12%(p/v) en la zona de separación y de 5% (p/v) en la zona de concentración. A 10 mg de derivado enzimático se le adicionaron 30 μ L de buffer de ruptura y se calentaron en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos. Posteriormente, fueron mantenidas en baño de hielo durante 5 minutos. Finalmente, se adicionaron 20 μ L de muestra. La electroforesis se llevó a cabo en un equipo PowerPac HC (BIORAD), a temperatura ambiente y a un voltaje de 150V durante 1 hora.

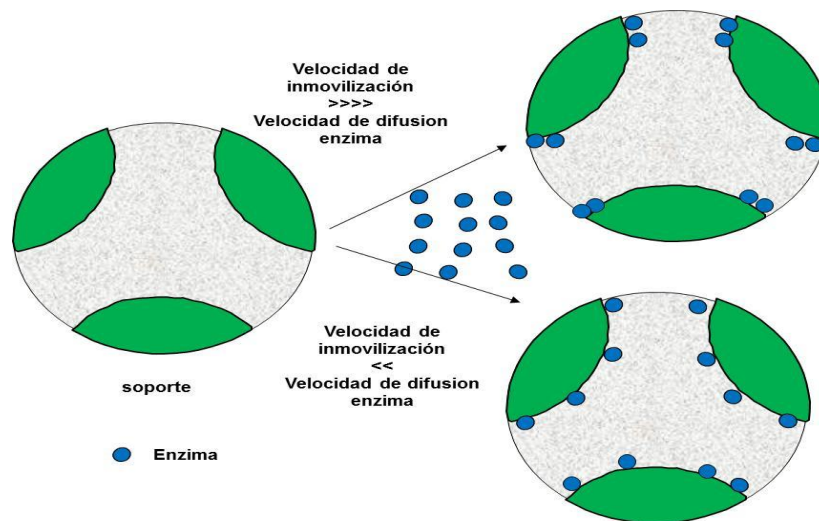
5.4.3.2 Electroforesis en condiciones no desnaturizantes (nativa-PAGE). Para la electroforesis en condiciones no desnaturizantes o nativa-PAGE (Laemmli, 1970 modificado), 50 mg de derivado enzimático fueron re-suspendidos en 0.5 mL de una solución de Tritón al 1% (v/v) en buffer fosfato 25mM pH 7 por 24 h a 4 °C. Al sobrenadante se le adicionó buffer de corrida sin SDS ni mercaptoetanol. Finalmente, se adicionaron 20 μ L de muestra en geles de

concentración 5%(p/v) y de separación 12%(p/v) de poliacrilamida sin SDS, a temperatura ambiente y a un voltaje 150V durante 4h en un equipo PowerPAC HC (BIORAD).. El revelado de las proteínas se realizó mediante tinción con azul brillante de Coomassie R-250 y usando marcadores de peso molecular (200-7 kDa). Los geles obtenidos fueron posteriormente escaneados con un densitómetro UMAX PowerLook 2100XL y visualizados a través del software PDQuest (Biorad)

5.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.5.1 Inmovilización de CALB por adsorción hidrofóbica sobre Octil-agarosa (OC). Teniendo en cuenta que la distribución de una enzima sobre la superficie porosa de un soporte puede darse de forma homogénea o heterogénea, de acuerdo a la velocidad de interacción enzima-soporte (**Figura 48**). La CALB fue inmovilizada en Octil-agarosa, a través de dos estrategias: 1) inmovilización convencional descrita por Sabuquillo y Col., 1995. 2) inmovilización en presencia de etanol.

Figura 48. Efecto de la velocidad de inmovilización enzima-soporte sobre la distribución de la enzima en los poros del soporte.



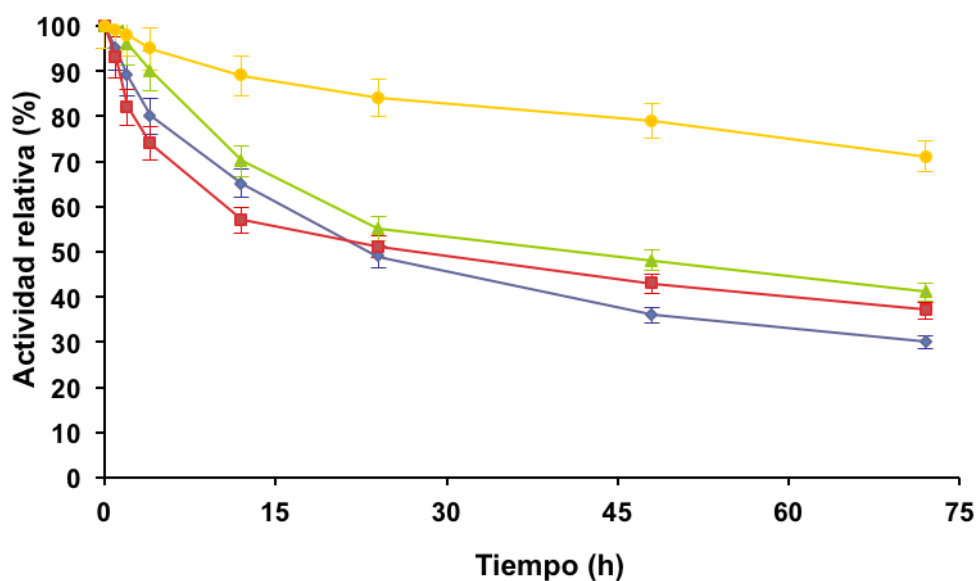
5.5.1.1 Inmovilización convencional de CALB en Octil-agarosa. La CALB fue inmovilizada en el soporte Octil-agarosa a baja fuerza iónica de acuerdo a lo descrito por Sabuquillo y Col., 1995 (numeral 3.1.1). Al cabo de una hora se observó un 95 % de inmovilización de CALB, de acuerdo con la actividad enzimática en el sobrenadante. La carga enzimática sobre el derivado fue de 0,5 mg de proteína/g de soporte. El derivado obtenido fue llamado **OC-CALB-C**.

5.5.1.2 Inmovilización de CALB sobre Octil-agarosa en presencia de Etanol. Efecto de la concentración de etanol sobre la velocidad de inmovilización.

Con el fin de regular la velocidad de inmovilización de CALB sobre el soporte Octil-agarosa y favorecer una distribución homogénea de la enzima sobre el soporte (**Figura 48**), se evaluó el efecto de diferentes solventes orgánicos de naturaleza polar (acetonitrilo, dioxano y etanol) sobre la velocidad de adsorción de CALB en el soporte.

Inicialmente se evaluó la estabilidad de CALB en presencia de acetonitrilo (30% v/v), tetrahidrofurano (30% v/v), isopropanol (30% v/v) y etanol (30% v/v), con el fin de seleccionar el solvente orgánico que no afectara de forma drástica la actividad enzimática de CALB en la hidrólisis de pNPB. Los resultados obtenidos (**figura 49**) muestran que transcurridas 72 horas de incubación, el etanol ocasionó el menor efecto inactivante sobre CALB en comparación con los demás solventes orgánicos. Por lo tanto, se seleccionó el etanol para realizar los estudios posteriores de inmovilización de CALB en Octil-agarosa.

Figura 49. Estabilidad de CALB soluble en presencia de diferentes solventes orgánicos. Los experimentos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección métodos experimentales, numeral 3.1.2. (●) Etanol 30 % (v/v)/ buffer fosfato 10 mM pH7; (▲) tetrahidrofurano 30% (v/v)/ buffer fosfato 10 mM pH 7; (■) isopropanol 30% (v/v)/ buffer fosfato 10 mM pH 7; (◆) Acetonitrilo 30% (v/v)/ buffer fosfato 10 mM pH 7.

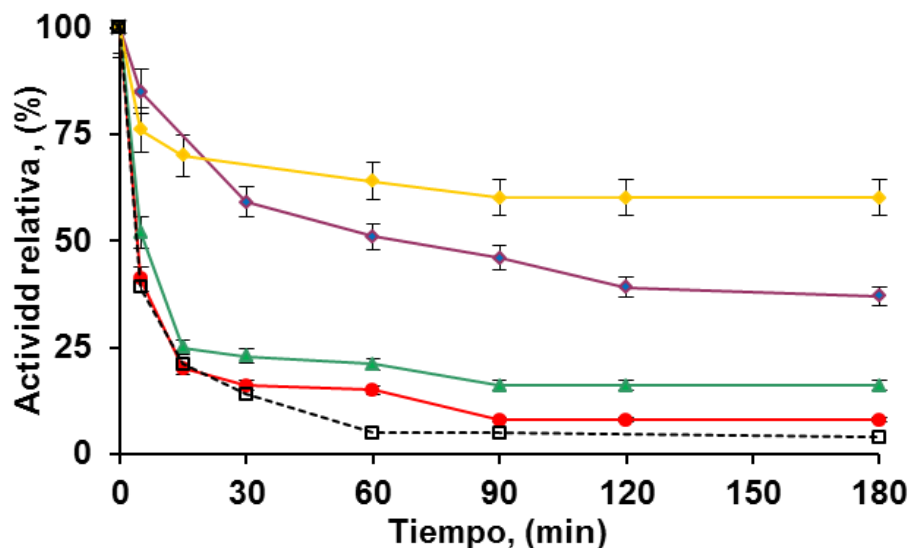


Se evaluó el efecto de la concentración de etanol al 10%, 20%, 30% y 40% v/v sobre la velocidad de inmovilización de CALB en octil-agarosa de acuerdo con lo descrito en el numeral 3.1.2. **La figura 50** muestra que con el incremento sucesivo de la concentración de etanol, la velocidad de inmovilización sobre Octil-agarosa disminuyó en comparación con el proceso de inmovilización convencional (en ausencia de etanol).

Se observó (**figura 50**) que usando etanol al 20% v/v, el porcentaje de rendimiento de inmovilización disminuyó 12% en comparación con el proceso de inmovilización convencional. El incremento en la concentración de etanol al 30% v/v y 40 % v/v ocasionó la disminución de la velocidad de inmovilización en un 33% y 56%, respectivamente. Teniendo en cuenta que la adsorción de CALB sobre el soporte

octil-agarosa es una cromatografía de afinidad que se da a través de interacciones hidrofóbicas, los resultados obtenidos sugieren que el uso de etanol al 30% v/v y 40% v/v generó probablemente un efecto de apantallamiento entre la superficie del soporte y la enzima, disminuyendo la velocidad de interacción enzima-soporte y permitiendo una mayor distribución homogénea de CALB sobre los poros del soporte Octil-agarosa (**figura 48b**) (Dennis y col., 1992; Hossain y Do, 1992; Gutenwik y col., 2004; Blanco y col., 2007; Bolivar y col., 2011). Los derivados obtenidos en presencia de etanol se llamaron **OC-CALB-E**.

Figura 50. Efecto de la concentración de etanol sobre la velocidad de inmovilización de CALB en octil agarosa. Las inmovilizaciones se realizaron a 4 °C en buffer fosfato de Sodio 5 mM a pH 7,0 en presencia de concentraciones de etanol al: (□) etanol (0% v/v); (●) etanol 10% v/v; (▲) etanol 20% v; (◆) etanol 30% v/v; (◇) etanol 40% v/v.



5.5.2 Modificación parcial y masiva de los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído

5.5.2.1 Modificación de OC-CALB-C con glutaraldehído. Los residuos de lisina presentes en los derivados OC-CALB-C fueron modificados al 25%, 50% y 100% con glutaraldehído. El control del grado de modificación parcial de los grupos amino se realizó regulando la concentración de glutaraldehído y el valor de pH en el medio de reacción. Previamente, Fernández-Lafuente y Col., (1995), y posteriormente Palomo y Col., (2007), estandarizaron las condiciones de reacción (glutaraldehído 0.5% (v/v) a pH 7 por 1 h) que favorecían la modificación del 100 % de los residuos lisínicos de la penicilina G acilasa y de la lipasa de páncreas porcino, respectivamente.

En la **tabla 21**, se muestran los distintos grados de modificación del derivado OC-CALB-C al disminuir la concentración de glutaraldehído de 0.5% v/v a 0.1% v/v, el valor de pH del medio de reacción de 7 a 6 y el tiempo de reacción de 1 h a 30 min. Por ejemplo, para lograr la modificación del 25% de los grupos amino presentes en la superficie enzimática de CALB, bastó una concentración de 0.1 % (v/v) de glutaraldehído, un valor de pH del medio de reacción de 6 y 30 minutos de reacción. La modificación del 50% de los residuos de lisina se obtuvo utilizando glutaraldehído 0.1 % (v/v), a pH 7, durante 1 hora de reacción. El grado de modificación se determinó mediante la titulación con TNBS de los grupos aminos primarios disponibles en el derivado de CALB después del tratamiento con glutaraldehído. Los ensayos se realizaron según lo descrito en la en la sección 4.2.

Los derivados de OC-CALB-C modificados al 25%, 50% y 100% con glutaraldehído fueron llamados OC-CALB-C-GLU-25%, OC-CALB-C-GLU-50% y OC-CALB-C-GLU-100%.

Tabla 21. Efecto de las condiciones experimentales (pH/concentración de glutaraldehído (% v/v)/ tiempo de reacción, h) sobre el grado de modificación de OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído. El grado de modificación fue calculado por titulación de los grupos amino con TNBS como se describió en el numeral 4.2. Se utilizó como blanco de reacción, Octil-agarosa tratado con TNBS.

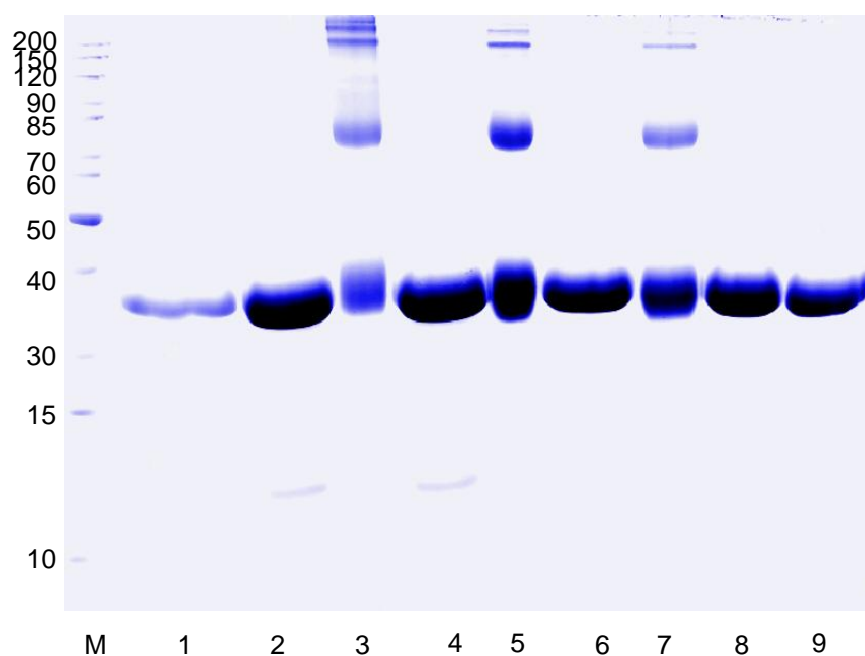
Condiciones experimentales			Abs	Grado de modificación (%)
pH	Tiempo (h)	glutaraldehído (% v/v)		
OC-CALB-C sin modificar			0.759	0
6	1	0.05	0.672	11.5 ± 2
6	0.4	0.1	0.601	21 ± 2
6	0.5	0.1	0.556	25 ± 2
7	0.5	0.1	0.485	36 ± 3
7	1	0.1	0.383	50 ± 1
7	1	0.5	0.06	100±2

5.5.2.2 Modificación de OC-CALB-E con glutaraldehído. Los derivados OC-CALB-E obtenidos en presencia de etanol al 10%, 20% 30% y 40% v/v, fueron inicialmente modificados masivamente (100%) con glutaraldehído de acuerdo a las condiciones descritas en la **tabla 20**.

La **figura 51** muestra la caracterización electroforética de los derivados OC-CALB-E modificados al 100% con glutaraldehído. De allí se observó que la modificación de los derivados OC-CALB-E obtenidos en presencia de etanol al 30% v/v y 40% v/v con glutaraldehído ocasionó el entrecruzamiento intramolecular de CALB. En el caso de los derivados obtenidos en presencia de etanol al 10% y 20% la modificación generó la formación de agregados diméricos y tetraméricos de CALB, producto en este caso, del entrecruzamiento intermolecular. Por lo tanto, los

resultados obtenidos sugieren que el uso de concentraciones de etanol al 30% v/v y 40% v/v en el proceso de inmovilización de CALB en Octil permitió que las moléculas de CALB difundieran de forma homogénea sobre los poros del soporte, ubicándose lo suficientemente alejadas entre sí, lo que evitó que el tratamiento con glutaraldehído generara entrecruzamientos intermoleculares.

Figura 51. Electroforesis SDS-PAGE de los derivados OC-CALB-E obtenidos en presencia de diferentes concentraciones de etanol y posteriormente modificados masivamente con glutaraldehído. Línea M: marcador de peso molecular; Carril 1: CALB soluble; Carril 2 y Carril 3, OC-CALB-C y OC-CALB-C-GLU-100% obtenidos en ausencia de ETOH, respectivamente. Carril 4 y Carril 5 OC-CALB-E y OC-CALB-E-GLU-100% obtenidos en ETOH 10% v/v, respectivamente. Carril 6 y Carril 7, OC-CALB-E y OC-CALB-E-GLU-100% obtenidos en ETOH 20% v/v, respectivamente. Carril 8, OC-CALB-E-GLU-100% obtenido en ETOH 30% v/v. Carril 9, OC-CALB-E-GLU-100% obtenido en ETOH 40% v/v.



Con el fin de evaluar el efecto del entrecruzamiento intramolecular de CALB con glutaraldehído sobre las propiedades biocatalíticas de la enzima, se seleccionaron

los derivados obtenidos en presencia de etanol 30% v/v y se modificaron parcialmente (25% y 50%) con glutaraldehído, de acuerdo con las condiciones estandarizadas en la sección 5.2.1, **tabla 20**. Los derivados obtenidos mediante esta estrategia se llamaron OC-CALB-E-GLU-25%, OC-CALB-E-GLU-50% y OC-CALB-E-GLU-100%.

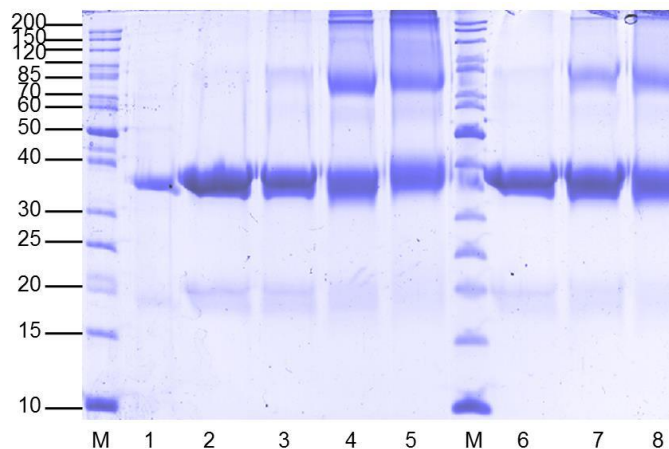
5.5.3 Caracterización electroforética de los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E modificados al 25%, 50% y 100% con glutaraldehído. Los derivados OC-CALB-C, OC-CALB-C-GLU-25%, OC-CALB-C-GLU-50%, OC-CALB-C-GLU-100% y los derivados modificados obtenidos en etanol, OC-CALB-E, OC-CALB-E-25%, OC-CALB-E-50% y OC-CALB-E-100% fueron caracterizados mediante estudios electroforéticos en condiciones desnaturalizantes y no-desnaturalizantes.

La **figura 52**, muestra la electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E modificados con glutaraldehído. Se observa que la modificación de los derivados OC-CALB-C con glutaraldehído ocasionó la formación de grandes agregados moleculares de enzima, lo que sugiere que el tratamiento con glutaraldehído generó entrecruzamientos intermoleculares. El entrecruzamiento intermolecular aumentó con el grado de modificación. Así, el derivado OC-CALB-E-100% mostró una mayor concentración de dímeros y tetrámeros de CALB que los derivado OC-CALB-E-50% y OC-CALB-25%. Los resultados obtenidos sugieren que en los derivados OC-CALB-C, la enzima se encuentra distribuida de forma heterogénea sobre la superficie del soporte, permitiendo con ello que las moléculas de lipasa estén muy próximas entre sí, lo cual facilita que el tratamiento con glutaraldehído genere entrecruzamientos intermoleculares.

El entrecruzamiento intermolecular ocasionado por el glutaraldehído en los derivados OC-CALB-C, contrasta con lo observado en los derivados OC-CALB-E-GLU. Los derivados OC-CALB-E-GLU-25%, OC-CALB-E-GLU-50% y OC-CALB-

GLU-100% mostraron que el tratamiento con glutaraldehído ocasionó mayoritariamente el entrecruzamiento intramolecular, reflejado en la presencia de la banda característica del monómero de CALB en 32 Kda. Es notable que en los derivados OC-CALB-E-GLU-50% y OC-CALB-GLU-100% se presente una población minoritaria de agregados bimoleculares y tetramoleculares de CALB, ocasionada probablemente por el entrecruzamiento intermolecular. Sin embargo, predominó el entrecruzamiento intramolecular, lo que indica que es posible que la presencia de etanol 30% v/v en el proceso de inmovilización permitió distribuir uniformemente las moléculas de enzima en el interior de los poros del soporte a distancias suficientes para evitar el entrecruzamiento intermolecular y favorecer el intramolecular.

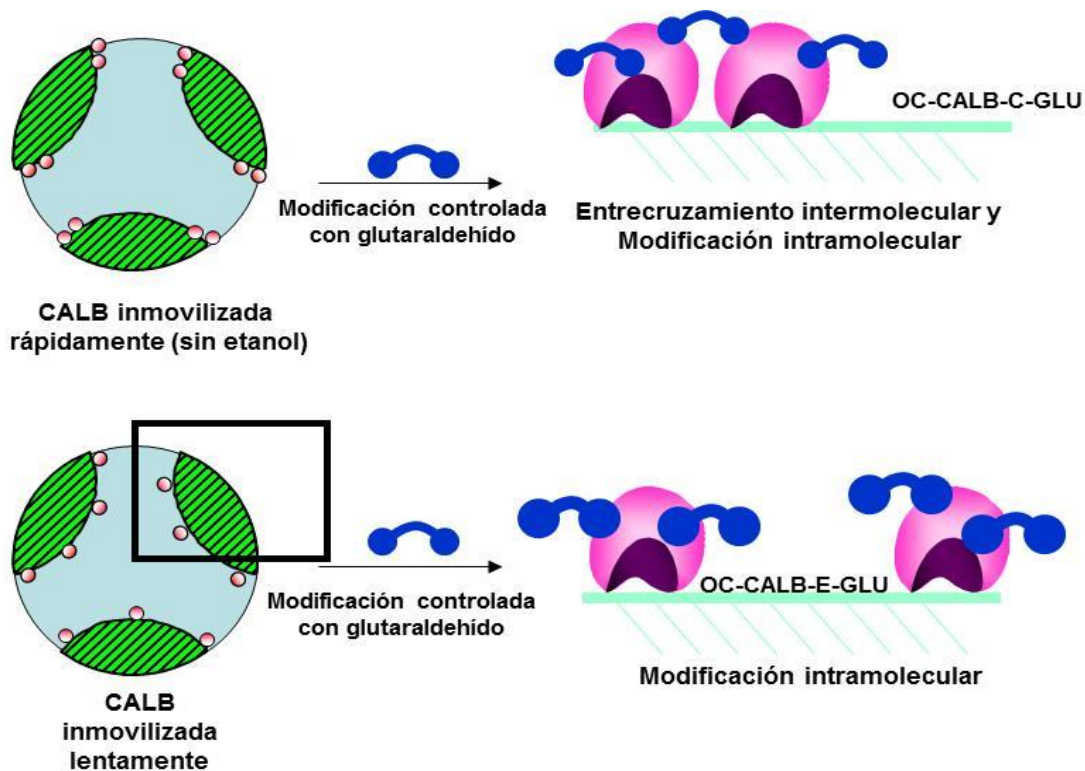
Figura 52. Electroforesis SDS-PAGE de los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E modificados al 25%, 50% y 100% con glutaraldehído. Carril M: marcador de peso molecular; Carril 1: CALB soluble; Carril 2: OC-CALB-C; Carril 3: OC-CALB-C-GLU-25%; Carril 4: OC-CALB-C-GLU-50%; Carril 5: OC-CALB-C-GLU-100%; Carril 6: , OC-CALB-E-GLU-25%; Carril 7, OC-CALB-E-GLU-50%; Carril 8: , OC-CALB-E-GLU-100%.



De la **figura 52**, se observa que la modificación de OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído permitió la obtención de dos conjuntos diferentes de derivados de

CALB producto del entrecruzamiento con glutaraldehído. Mientras el tratamiento con glutaraldehído de los derivados OC-CALB-C provocó mayoritariamente el entrecruzamiento intermolecular, el mismo tratamiento ocasionó en los derivados OC-CALB-E-GLU el entrecruzamiento intramolecular (**Figura 53**).

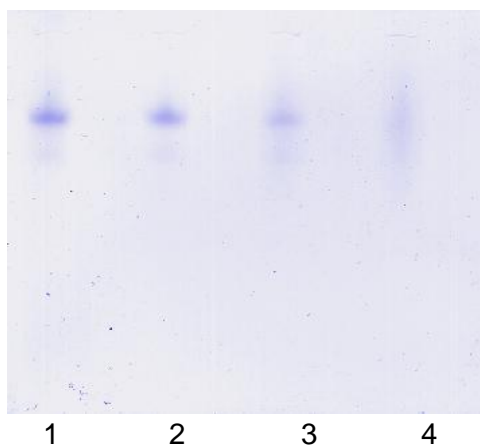
Figura 53. Efecto de la modificación de OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído sobre el tipo de entrecruzamiento proteico.



La caracterización de los derivados OC-CALB-E-GLU-25%, OC-CALB-E-GLU-50% y OC-CALB-E-GLU-100% por electroforesis en condiciones no-desnaturalizantes (PAGE-Nativa), en la cual las proteínas migran de acuerdo a su relación carga/masa (**Figura 54**), mostró que el entrecruzamiento intramolecular producido en la superficie enzimática de CALB por la modificación con glutaraldehído provocó problemas de difusión, que ocasionaron que la banda perteneciente a la proteína migrara más que la proteína no modificada. El efecto

de difusión fue más notable en los derivados OC-CALB-E-GLU-50% y OC-CALB-E-GLU-100%. El cambio en la movilidad electroforética de CALB se debió posiblemente a la compleja naturaleza química del glutaraldehído, que puede producir espontáneamente grupos carboxílicos por oxidación y deshidratación (Walt y Agayn, 1994; Dartiguenave y Col., 2004; Wine y Col., 2007).

Figura 54. Electroforesis Page-nativa de los derivados OC-CALB-E-GLU. Los experimentos fueron realizados de acuerdo a lo descrito en la sección 4.3.2 Carril 1: marcador de peso molecular; Carril 2: OC-CALB-E-GLU-25%; Carril 3: OC-CALB-E-GLU-50%; Carril 4 OC-CALB-E-GLU-100%.



5.5.4 Efecto de la modificación controlada de los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído sobre la fuerza de adsorción enzima-soporte.

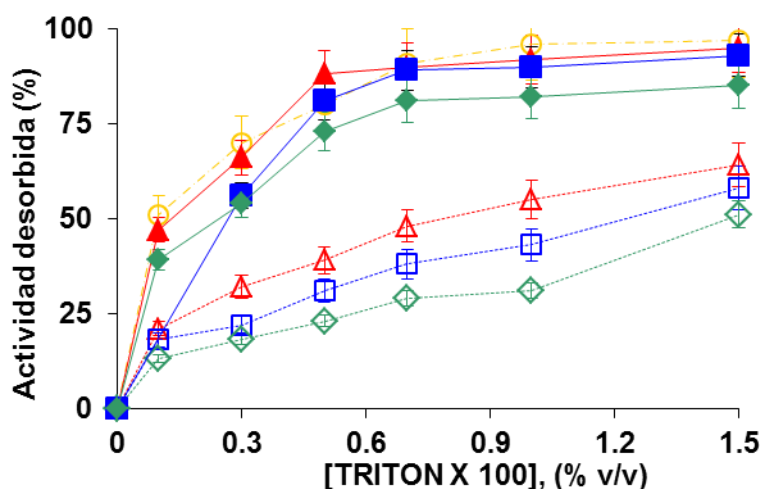
La **figura 55** muestra el perfil de desorción de CALB en las preparaciones inmovilizadas y modificadas con glutaraldehído usando Tritón 0.1% v/v.

Los perfiles de desorción de los derivados OC-CALB-C-GLU muestran que, con el aumento progresivo de la concentración de tritón hasta 1.5% v/v, fue posible la desorción del 55% de monómero de CALB inmovilizado en el derivado OC-CALB-C-GLU-25%. En los derivados OC-CALB-C-GLU-50% y OC-CALB-C-GLU-100% solo fue posible liberar del soporte, en torno a 50% y 44% del monómero de

CALB, respectivamente. El porcentaje de enzima no desorbida correspondió a los agregados diméricos y tetraméricos altamente hidrofóbicos formados por el entrecruzamiento intermolecular, y confirmados por la electroforesis SDS-PAGE (figura 52).

Por su parte, la incubación de los derivados OC-CALB-E-GLU-25%, OC-CALB-E-GLU-50% y OC-CALB-E-GLU-100% en concentraciones progresivas de tritón (hasta 1.5% v/v), permitió desorber del soporte Octil-agarosa, el 85%, 80% y 75% del monómero de CALB, respectivamente. Los resultados obtenidos confirman que la modificación del derivado OC-CALB-E con glutaraldehído ocasionó por tanto entrecruzamientos intramoleculares mayoritariamente.

Figura 55. Perfil de desorción de los derivados OC-CALB-C-GLU y OC-CALB-E-GLU del soporte Octil-agarosa. Los derivados de CALB fueron incubados en concentraciones crecientes de tritón X-100, como se describe en el numeral 3.5. (○) OC-CALB-C; (△) OC-CALB-C-GLU-25%; (□) OC-CALB-C-GLU-50%; (◇) OC-CALB-C-GLU-100%; (▲) OC-CALB-E-GLU-25%; (■) OC-CALB-E-GLU-50%; (◆) OC-CALB-E-GLU-100%.



5.5.5 Efecto de la modificación de los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído sobre la actividad enzimática frente al pNPB. La actividad

enzimática de los derivados OC-CALB-C-GLU-25%, OC-CALB-C-GLU-50%, OC-CALB-C-GLU-100%, OC-CALB-E-GLU-25%, OC-CALB-E-GLU-50% y OC-CALB-E-GLU-100% fue evaluada en la hidrólisis del p-NPB, 0.4 mM y a pH 7, de acuerdo con lo descrito en la sección de métodos analíticos, numeral 4.1.

La **tabla 22** muestra que las modificaciones realizadas sobre el derivado OC-CALB-C con glutaraldehído ocasionaron un incremento en la actividad enzimática frente al p-NPB. Los derivados obtenidos por modificaciones parciales, OC-CALB-C-GLU-25% y OC-CALB-C-GLU-50% fueron 13.3% y 4% más activos respectivamente que el derivado no modificado OC-CALB-C. Es de resaltar la actividad del derivado OC-CALB-C-GLU-100%, el cual fue 26.6% más activo que el derivado OC-CALB-C. Es probable que el incremento en la actividad de los derivados OC-CALB-C-GLU se deba a los entrecruzamientos intermoleculares generados por la reacción entre el glutaraldehído y los residuos de lisina de dos moléculas de lipasa muy próximas entre sí. El entrecruzamiento estaría ocasionando un cambio en la forma exacta del centro activo de la enzima al aumentar la rigidez en ciertas zonas de la proteína.

De forma similar al derivado OC-CALB-C, el tratamiento con glutaraldehído del derivado OC-CALB-E ocasionó un incremento en la actividad enzimática frente a la hidrólisis del pNPB, excepto para el derivado OC-CALB-E-GLU-25% en donde redujo la actividad enzimática en un 8.3%. Los derivados OC-CALB-E-GLU-50% y OC-CALB-E-GLU-100% fueron 4% y 23.6%, respectivamente, más activos que el derivado OC-CALB-E. Las diferencias de actividad en los derivados OC-CALB-E-GLU se deben posiblemente a los cambios conformacionales que sufre la estructura 3D de la enzima, en este caso por el entrecruzamiento intramolecular ocasionado por el glutaraldehído en la molécula de lipasa. A diferencia de los derivados OC-CALB-C-GLU en donde se favoreció el entrecruzamiento intermolecular, en los derivados OC-CALB-E-GLU, las moléculas de lipasa se

encontrarían distribuidas de forma homogénea sobre el soporte, y más alejadas entre sí.

Tabla 22. Actividad enzimática de los derivados de OC-CALB-C y OC-CALB-E modificados parcial y masivamente con glutaraldehído en la hidrólisis de p-NPB, 0.4 mM a pH 7. Los experimentos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos analíticos, numeral 4.1. ^{a)} Actividad antes de reducción con NaBH₄, ^{b)} Actividad después de reducción con NaBH₄.

Derivado	Actividad(U/g) ^a	Actividad (U/g) ^b
OC-CALB-C	7.5 ± 0.3	NR
OC-CALB-C-GLU-25%	8.5 ± 0,1	8.3± 0.1
OC-CALB-C-GLU-50%	7.8 ± 0.2	7.5 ± 0.2
OC-CALB-C-GLU-100%	9.5± 0.1	9.3± 0.1
OC-CAL-C	7.2± 0,2	NR
OC-CALB-C-GLU-25%	6.3± 0.3	6.6± 0.2
OC-CALB-C-GLU-50%	7.5± 0.2	7.4± 0.1
OC-CALB-C-GLU-100%	9.9 ± 0.2	8.9± 0.2

5.5.6 Efecto del pH sobre la actividad enzimática de los derivados OC-CALB-C-GLU y OC-CALB-E-GLU frente al pNPB. La figura 56 muestra que la modificación de las moléculas de CALB con glutaraldehído produjo un cambio significativo en el perfil pH/actividad de la enzima.

La modificación de los derivados OC-CALB-C con glutaraldehído alteró dramáticamente la actividad enzimática de CALB frente al pNPB en el rango de valores de pH estudiados (valores de pH entre 5 y 10). A pH 7, la modificación produjo un leve incremento en la actividad de los derivados OC-CALB-C-GLU-25%

y OC-CALB-C-GLU-50% (incremento del 2% y 4%, respectivamente) frente al pNPB, en comparación con el derivado OC-CALB-C no modificado. El incremento fue más notable en el derivado modificado masivamente OC-CALB-C-GLU-100%, el cual fue 20% más activo que el derivado OC-CALB-C.

La disminución del valor de pH a 6 ocasionó la disminución de la actividad del derivado OC-CALB-C con respecto a la actividad exhibida por el derivado a pH 7. Los derivados OC-CALB-C-GLU-25%, OC-CALB-C-GLU-50% y OC-CALB-C-GLU-100% fueron más activos en comparación con la actividad exhibida frente al pNPB a pH 7. Sin embargo, no se evidenció una correlación directa entre el incremento de la actividad enzimática y el grado de modificación.

A pH 5, el derivado OC-CALB-C-GLU-100% fue 77% más activo que el derivado OC-CALB-C, mientras que los derivados OC-CALB-C-GLU-25% y OC-CALB-C-GLU-50% fueron 34.4% y 1.6%, respectivamente, más activos que el derivado no modificado.

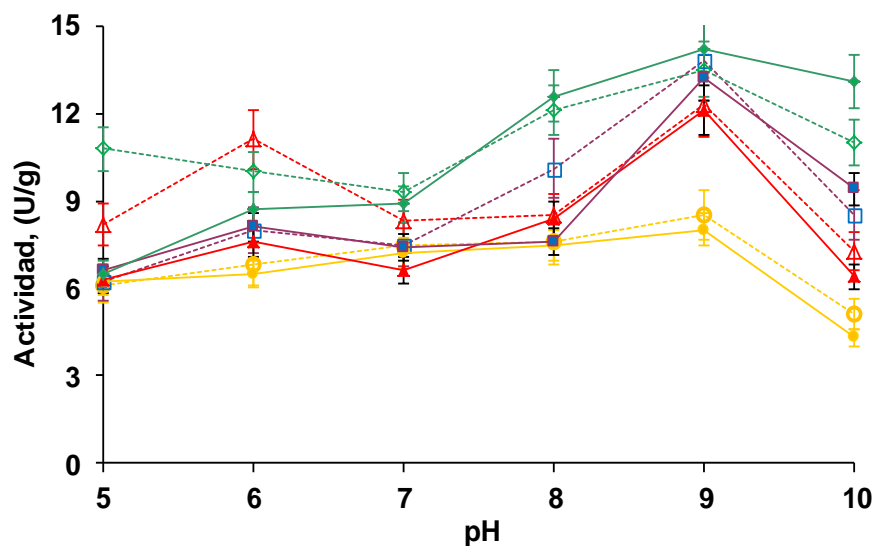
A pH 9, los derivados OC-CALB-C-GLU exhibieron el máximo valor de actividad frente al pNPB. Los derivados OC-CALB-C-GLU-25%, OC-CALB-C-GLU-50% y OC-CALB-C-GLU-100% fueron 48.8%, 84% y 45%, respectivamente, más activos frente al pNPB que a pH 7.

Las diferencias encontradas en la actividad de los derivados OC-CALB-C-GLU a valores de pH comprendidos en el rango entre 5 y 10 frente al pNPB, se deben posiblemente a los cambios conformacionales que sufre la enzima en la estructura 3D por cuenta de los entrecruzamientos intermoleculares ocasionados por el glutaraldehído.

La modificación de los derivados OC-CALB-E con glutaraldehído produjo cambios en el perfil pH/actividad de la enzima. Por ejemplo, en el rango de valores de pH

de 5 a 7, los derivados OC-CALB-E-GLU-25%, OC-CALB-E-GLU-50% y OC-CALB-E-GLU-100% fueron más activos (sin exceder el 24% de incremento) que el derivado no modificado OC-CALB-E. A valores de pH alcalino, la modificación produjo una mejora significativa en la actividad enzimática de los derivados OC-CALB-E-GLU proporcional al grado de modificación obtenido. A pH 8 y pH 9, el derivado OC-CALB-E-GLU-100% fue 68% y 77.5%, más activo respectivamente, que el derivado OC-CALB-E. Los resultados obtenidos sugieren que el entrecruzamiento intramolecular de residuos de lisina cercanos entre sí en la molécula de CALB con glutaraldehído, ocasionó la rigidificación de zonas aminoacídicas cercanas al centro activo, evitando con ello, cambios conformacionales drásticos en la estructura 3D de la enzima por cuenta del valor de pH.

Figura 56. Influencia del valor del pH sobre la actividad de los diferentes derivados modificados de OC-CALB. Los experimentos se realizaron a 25 °C, usando p-NPB como sustrato, de acuerdo a lo descrito en la sección 3.3. Derivados: (○) OC-CALB-C; (△) OC-CALB-C-GLU-25%; (□) OC-CALB-C-GLU-50%; (◇) OC-CALB-C-GLU-100%; (●) OC-CALB-E (▲)OC-CALB-E-GLU-25%; (■)OC-CALB-E-GLU-50%; (◆) OC-CALB-E-GLU-100%.



5.5.7 Estabilidad de los derivados de OC-CALB-C y OC-CALB-E modificados con glutaraldehídos

5.5.7.1 Estabilidad térmica de los derivados OC-CALB-C-GLU y OC-CALB-E-GLU a pH 5, 7 y 9. La estabilidad de los derivados OC-CALB-C-GLU y OC-CALB-E-GLU fue evaluada a pH 5 y pH 7 a 60°C y pH 9 a 50°C, de acuerdo a lo descrito en la sección métodos experimentales, numeral 3.4.1. La **tabla 23** resume los tiempos de vida media para los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E modificados con glutaraldehído.

Tabla 23. Tiempos de vida media (horas) de los derivados OC-CALB-C-GLU y OC-CALB-E-GLU a diferentes condiciones de inactivación térmica. Los experimentos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 3.4.

DERIVADO	Tiempo de vida media (h)		
	pH 5, 60°C	pH 7, 60°C	pH 9, 50°C
OC-CALB-C	5 ± 0.3	16 ± 0.7	20 ± 1
OC-CALB-C-GLU-25%	15 ± 0.7	40 ± 1	58 ± 3
OC-CALB-C-GLU-50%	45 ± 1	85 ± 3	77 ± 3
OC-CALB-C-GLU-100%	110 ± 3	130 ± 5	100 ± 5
OC-CALB-E	5 ± 0.2	15.5 ± 0.5	20.5 ± 0.5
OC-CALB-E--GLU-25%	10.5 ± 0.5	20 ± 0.5	30 ± 0.7
OC-CALB-E--GLU-50%	15 ± 0.9	38 ± 0.6	35 ± 1.3
OC-CALB-E--GLU-100%	30 ± 1.3	52 ± 0.9	20 ± 1.1

De la **tabla 23**, se puede ver que a pH 5 y 60°C, los derivados OC-CALB-C-GLU-25%, OC-CALB-C-GLU-50% y OC-CALB-C-GLU-100%, fueron 3, 9 y 22 veces más estables respectivamente, que el derivado OC-CALB-C. A su vez, a pH 7 y

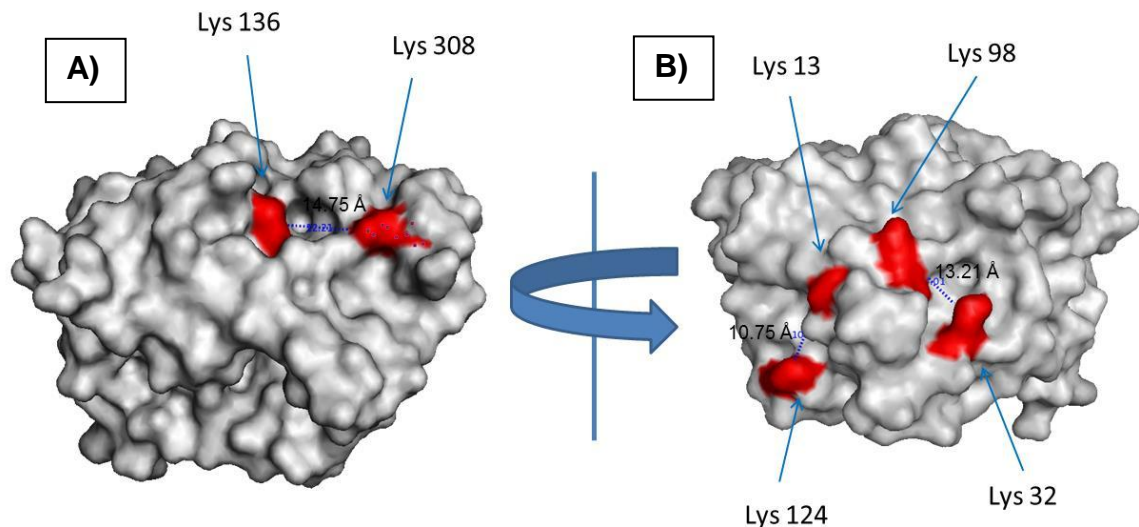
60°C, fueron 2.5, 5.3 y 8.1 veces más estables respectivamente, que el derivado no modificado. Con el cambio en las condiciones de inactivación a pH 9 y 50°C, la estabilidad de los derivados OC-CALB-C-GLU disminuyó con respecto a la mostrada a pH 5 y 60°C. No obstante, los derivados OC-CALB-C-GLU-25%, OC-CALB-C-GLU-50% y OC-CALB-C-GLU-100% fueron de nuevo más estables que el derivado OC-CALB-C en un factor de 2.9, 3.8 y 5 respectivamente. La alta estabilidad exhibida por los derivados OC-CALB-C-GLU y en especial del derivado OC-CALB-C-GLU-100% sugiere que la modificación con glutaraldehído generó mayoritariamente la formación de agregados diméricos y tetraméricos de CALB a través de entrecruzamientos intermoleculares -evidenciados en la electroforesis SDS-PAGE, figura 52- que rigidificaron la estructura 3D de las moléculas de lipasa, evitando cambios conformacionales desfavorables por cuenta de la temperatura.

La modificación parcial y masiva de los derivados OC-CALB-E con glutaraldehído incrementó la estabilidad de los derivados OC-CALB-E-GLU en las condiciones de inactivación estudiadas en comparación con el derivado no modificado. Por ejemplo, a pH 5 y 60°C, los derivados OC-CALB-E-25%, OC-CALB-E-GLU-50% y OC-CALB-E-GLU-100% fueron 2.1, 3 y 6 veces más estables respectivamente, que el derivado OC-CALB-E, mientras que a pH 7 y 60°C, fueron 1.3, 2.5 y 3.4 veces más estables que el derivado no modificado. A pH 9 y 50°C, los derivados OC-CALB-E-25% y OC-CALB-E-GLU-50% fueron 1.5 y 1.7 veces más estables respectivamente que el derivado OC-CALB-E. El derivado OC-CALB-E-GLU-100% conservó la misma estabilidad del derivado no modificado.

Además, los derivados OC-CALB-E-GLU fueron menos estables en las condiciones de inactivación estudiadas (pH 5 y 60°C, pH 7 y 60°C, pH 9 y 50°C) que los derivados OC-CALB-C-GLU. Las diferencias en la estabilidad entre los derivados OC-CALB-E-GLU y OC-CALB-C-GLU, se deben probablemente a la contribución del tipo de entrecruzamiento producido por la modificación con

glutaraldehído. Por otro lado, en los derivados OC-CALB-C-GLU, el tratamiento con glutaraldehído causó un intenso entrecruzamiento intermolecular. En el caso de los derivados OC-CALB-E-GLU la modificación ocasionó el entrecruzamiento intramolecular del monómero de CALB que rigidificó solo las zonas de la superficie proteica involucradas en la formación del enlace covalente entre 2 residuos de lisina cercanos entre sí con el glutaraldehído. La **figura 57** muestra que en la estructura 3D de CALB, es posible encontrar que los residuos Lys 136 y 308, Lys 98 y 32, y Lys 13 y 134 podrían estar lo suficientemente cerca para permitir la formación de un entrecruzamiento intramolecular y con ello la rigidificación de estas zonas.

Figura 57. Modelo de estructura de superficie 3D de CALB indicando los grupos amino (color rojo) y la distancia entre los grupos más cercanos. A) Cara frontal (lid). B) cara posterior. La estructura de superficie 3D de CALB fue obtenida de Protein Data Bank (código PDB: 1TCA) y visualizada usando Pymol 0.99.



5.5.7.2 Estabilidad de los derivados OC-CALB-C-GLU y OC-CALB-E-GLU en presencia de DMSO (50% v/v) a pH 7 y 50°C. La estabilidad de los derivados

OC-CALB-C-GLU y OC-CALB-E-GLU fue evaluada en Dimetil-sulfóxido (DMSO) 50% (v/v) / buffer tris-HCl 100 mM, pH 7 a 45°C de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 3.4.2. La elección de DMSO 50% v/v se realizó después de establecer que ocasionó un mayor efecto inactivante sobre el derivado OC-CALB-C (disminuyó en un 50% la actividad inicial del derivado después de 24 horas de incubación) en comparación con los co-disolventes orgánicos, dioxano 50% v/v, dimetil-formamida 50% v/v y tetrahidrofurano 50% v/v a 25°C. La temperatura de incubación fue incrementada a 45°C con el fin de acelerar la velocidad de inactivación de los derivados OC-CALB-C-GLU y OC-CALB-E-GLU.

La **tabla 24** muestra que la modificación de los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído incrementó la estabilidad de CALB en presencia de DMSO 50% v/v / buffer tris-HCl 100 mM, pH 7 a 45°C. Los derivados OC-CALB-C-GLU-25%, OC-CALB-C-GLU-50% y OC-CALB-C-GLU-100% fueron 2.3, 6.4 y 13.7 veces más estables respectivamente, que el derivado no modificado OC-CALB-C. Por otro lado, los derivados OC-CALB-E-GLU-25%, OC-CALB-E-GLU-50% y OC-CALB-E-GLU-100%, fueron más estables que el derivado OC-CALB-E en un factor de 1.2, 2.5 y 8 veces respectivamente.

Los resultados obtenidos (**Tabla 24**) muestran que los derivados OC-CALB-C-GLU-25%, OC-CALB-C-GLU-50% y OC-CALB-C-GLU-100% fueron notablemente más estables en presencia de dioxano 50% v/v que los derivados OC-CALB-E-GLU-25%, OC-CALB-E-GLU-50% y OC-CALB-E-GLU-100%. Las diferencias en la estabilidad entre los dos conjuntos de derivados de CALB se debieron muy probablemente a la rigidez conferida en la estructura 3D de la enzima por el tipo de entrecruzamiento proteico ocasionado por el glutaraldehído. En los derivados OC-CALB-C-GLU, el glutaraldehído ocasionó entrecruzamientos intermoleculares de CALB, que generaron la formación de agregados diméricos y tetraméricos más estables, mientras que en los derivados OC-CALB-E-GLU, el glutaraldehído

generó mayoritariamente entrecruzamientos intramoleculares del monómero de CALB.

Tabla 24. Tiempos de vida media (horas) de los derivados OC-CALB-C-GLU y OC-CALB-E-GLU en presencia de DMSO 50% v/v/ buffer tris-HCl 100 mM, pH 7. Los experimentos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos experimentales, numeral 3.4.2

DERIVADO	Tiempo de vida media (h)
	Condición ambiental: DMSO (50 % v/v), 45°C, pH 7
OC-CALB-C	4.2 ± 0.2
OC-CALB-C-GLU-25%	9.5 ± 0.5
OC-CALB-C-GLU-50%	27 ± 2
OC-CALB-C-GLU-100%	55 ± 3
OC-CALB-E	4 ± 0.3
OC-CALB-E--GLU-25%	4.8 ± 0.4
OC-CALB-E--GLU-50%	10 ± 0.5
OC-CALB-E--GLU-100%	32 ± 4

5.6 CONCLUSIONES

- Se obtuvieron dos derivados de CALB inmovilizados en el soporte octil-agarosa a través de dos estrategias: 1) a través de la adsorción rápida de la enzima sobre el soporte (OC-CALB-C), a baja fuerza iónica en buffer fosfato sódico 5 mM. 2) Regulando la velocidad de inmovilización de CALB en el soporte (OC-CALB-E), usando etanol al 30% (v/v) como cosolvente.

- Los residuos de lisina de los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E fueron modificados al 25%, 50% y 100% con glutaraldehído. Para ello, se estandarizaron las condiciones de reacción, determinándose que la modificación del 25% de los grupos amino presentes en la superficie enzimática de CALB, se logró empleando glutaraldehído 0.1 % v/v a pH 6 durante 30 minutos de reacción. La modificación del 50% de los residuos lisínicos se obtuvo utilizando glutaraldehído 0.1 %v/v, a pH 7, durante 1 hora de reacción. Mientras que la modificación al 100% se obtuvo con glutaraldehído 0.5% v/v a pH 7 durante 1 hora de reacción.
- La modificación de OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído produjo dos conjuntos diferentes de derivados de CALB producto del tipo de entrecruzamiento proteico generado. Mientras el tratamiento con glutaraldehído de los derivados OC-CALB-C provocó mayoritariamente la formación de agregados diméricos y tetraméricos de CALB por el entrecruzamiento intermolecular, el mismo tratamiento ocasionó en los derivados OC-CALB-E-GLU el entrecruzamiento intramolecular del monómero de CALB.
- La modificación gradual de los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído produjo un incremento notable en la actividad enzimática de los derivados OC-CALB-C-GLU y OC-CALB-E-GLU en la hidrólisis del p-NPB, 0.4 mM a pH 7. Así, los derivados OC-CALB-C-GLU-25%, OC-CALB-C-GLU-50% y OC-CALB-C-GLU-100% fueron 13.3%, 4% y 26.6% más activos respectivamente, que el derivado no modificado OC-CALB-C. Mientras los derivados OC-CALB-E-GLU-50% y OC-CALB-E-GLU-100% fueron 4% y 23.6%, respectivamente, más activos que el derivado OC-CALB-E.
- La modificación de los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído alteró el pH óptimo de funcionamiento de CALB. En general los

derivados OC-CALB-C-GLU-25%, OC-CALB-C-GLU-50%, OC-CALB-C-GLU-100%, OC-CALB-E-GLU-25%, OC-CALB-E-GLU-50% y OC-CALB-E-GLU-100%, exhibieron la máxima actividad enzimática en la hidrólisis de pNPB a pH 9, mientras que el derivado no modificado fue más activo a pH 7.

- Los derivados OC-CALB-C-GLU fueron más estables bajo diferentes condiciones de inactivación térmica en comparación con el derivado no modificado. A pH 5 y 60°C, los derivados OC-CALB-C-GLU-25%, OC-CALB-C-GLU-50% y OC-CALB-C-GLU-100%, fueron 3, 9 y 22 veces más estables respectivamente, que el derivado OC-CALB-C, mientras que a pH 7 y 60°C, fueron 2.5, 5.3 y 8.1 veces más estables respectivamente, que el derivado no modificado. A pH 9 y 50°C los derivados OC-CALB-C-GLU-25%, OC-CALB-C-GLU-50% y OC-CALB-C-GLU-100% fueron más estables que OC-CALB-C en un factor de 2.9, 3.8 y 5 respectivamente.
- La modificación parcial y masiva de los derivados OC-CALB-E con glutaraldehído incrementó la estabilidad de los derivados OC-CALB-E-GLU en las condiciones de inactivación estudiadas (pH 5 y 60°C, pH 7 y 60°C, pH 9 y 50°C) en comparación con el derivado no modificado. Por ejemplo, a pH 5 y 60°C, los derivados OC-CALB-E-25%, OC-CALB-E-GLU-50% y OC-CALB-E-GLU-100% fueron 2.1, 3 y 6 veces más estables respectivamente, que el derivado OC-CALB-E, mientras que a pH 7 y 60°C, fueron 1.3, 2.5 y 3.4 veces más estables que el derivado no modificado. A pH 9 y 50°C, los derivados OC-CALB-E-25% y OC-CALB-E-GLU-50% fueron 1.5 y 1.7 veces más estables respectivamente que el derivado OC-CALB-E. El derivado OC-CALB-E-GLU-100% conservó la misma estabilidad del derivado no modificado.
- La modificación de los derivados OC-CALB-C y OC-CALB-E con glutaraldehído incrementó la estabilidad de CALB en presencia de DMSO 50% v/v / buffer tris-HCl 100 mM, pH 7 a 45°C. Los derivados OC-CALB-C-GLU-

25%, OC-CALB-C-GLU-50% y OC-CALB-C-GLU-100% fueron 2.3, 6.4 y 13.7 veces más estables respectivamente, que el derivado no modificado OC-CALB-C. Por su parte, los derivados OC-CALB-E-GLU-25%, OC-CALB-E-GLU-50% y OC-CALB-E-GLU-100%, fueron más estables que el derivado OC-CALB-E en un factor de 1.2, 2.5 y 8 veces respectivamente.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmed M, Kelly T, 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, Kirk O. “One Biocatalyst–Many Applications: The Use of *Candida antarctica* B-Lipase in Organic Synthesis”. *Biocatalysis and Biotransformation*. **(1998)**. 16 (3):181-204.
- Avila-González R, Pérez-Gilabert M, López-López M a, García-Carmona F. “*Candida rugosa* lipase-catalyzed intramolecular O- to N- transacylation of butyryl propranolol in the presence of cyclodextrins”. *Biotechnology progress*. **(2005)**. 21(2):338–342.
- Bailon P, Berthold W. “Polyethylene glycol-conjugated pharmaceutical proteins”. *Research focus*. **(1998)**. 1(8):352–356.
- Barbosa O, Ariza C, Ortiz C, 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, 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, Ortiz C, Torres R, 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, Ruiz M, Ortiz C, Fernández M, Torres R, Fernández-Lafuente R. “Modulation of the properties of immobilized CALB by chemical modification with 2,3,4-trinitrobenzenesulfonate or ethylenediamine. Advantages of using adsorbed lipases on hydrophobic supports”. *Process Biochemistry*. **(2012)**. 47: 867–876
- Barros M, Fleuri L, Macedo G. “Seed lipases: sources, applications and properties: a review”. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. **(2010)**. 27 (1): 15-29.
- Baslé E, Joubert N, Pucheault M. “Protein chemical modification on endogenous amino acids”. *Chemistry & biology*. **(2010)**. 17(3):213–27.
- Bastida A, Sabuquillo P, Armisen P, Fernández-Lafuente R, Huguet J, Guisan JM. “A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports”. *Biotechnology and Bioengineering*. **(1998)**. 58: 486-493.
- Betancor L, López-Gallego F, Hidalgo A, Alonso-Morales N, Mateo C, Dellamora-Ortiz G, et al. “Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions”. *Enzyme and Microbial Technology*. **(2006)**. 39:877–882.

- Bhatti H, Rashid M, Nawaz R, Asgher M, Perveen R, Jabbar A. "Purification and characterization of a novel glucoamylase from *Fusarium solani*". *Food Chemistry*. **(2007)**. 103 (2): 338-343.
- Bianchi D, Cesti P, Golini P. "Enzymatic preparation of optically active α and β -hydroxyaldehydes". *Tetrahedron*. **(1989)**. 45(3): 869-876.
- Blanco R, Terreros P, Muñoz N, Serra. "Ethanol improves lipase immobilization on a hydrophobic support". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **(2007)**. 47: 13–20.
- Bolivar JM, Hidalgo A, Sánchez-Ruiloba L, Berenguer J, Guisán JM, López-Gallego F. "Modulation of the distribution of small proteins within porous matrixes by smart-control of the immobilization rate". *Journal of Biotechnology*. **(2011)**. 155: 412– 420.
- Bosley JA, Clayton JC, "Blueprint for a lipase support: use of hydrophobic controlled-pore glasses as model systems". *Biotechnology Bioengineering*. **(1994)**. 43: 934–938.
- Brady L, Brzozowski A, Derewenda Z, Dodson E, Dodson G. "A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase". *Nature*. **(1990)**. 343: 767-770.
- Brzozowski A, Derewenda Z, Derewenda U, Dodson G, Lawson DM. "A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex". *Nature*. **(1991)**. 351: 491-494.

- Cabrera Z, Fernandez-Lorente G, Fernandez-Lafuente R, Palomo JM, Guisan JM. "Enhancement of Novozym-435 catalytic properties by physical or chemical modification". *Process Biochemistry*. **(2009)**. 44(2):226–231.
- Carrasco-López C, Godoy C, De las Rivas B, Fernandez-Lorente G, Palomo JM, Guisán JM, Fernández-Lafuente R, Martínez-Ripoll M, Hermoso J. "Activation of bacterial thermoalkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements". *Journal of Biological Chemistry*. **(2009)**. 284: 4365-4372.
- Carraway KL. Carbodiimide Modification of Proteins. *Proteins*. **(1966)**. 439(1956): 616–623.
- Carraway KL, Koshland DE. "Reaction of tyrosine residues in proteins with carbodiimide reagents". *Biochimica et Biophysica Acta*. **(1968)**. 160:272–274.
- Carraway KL, Spoerl P, Koshland DE. "Carboxyl group modification in chymotrypsin and chymotrypsinogen". *Journal of Molecular Biology*. **(1969)**. 42: 133–137.
- Casas-Godoy L, Duquesne S, Bordes F, Sandoval G, Marty A. "Lipases: An overview". *Methods in Molecular Biology*. **(2012)**. 861: 3-30.
- Chen C, Fujimoto Y, Girdaukas G, Sih C. "General Aspects and Optimization of Enantioselective Biocatalysis. In: *Organic Solvents: The Use of Lipases*". *Journal of the American Chemical Society*. **(1982)**. 104: 7294–7299.
- Chibata I, Tosa T, Sato T. "Biocatalysis: immobilized cells and enzymes". *Journal Molecular Catalysis*. **(1986)**. 37:1-24.

- Cowan DA, Fernandez-lafuente R. Enzyme and Microbial Technology “Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization.” Enzyme and Microbial Technology. **(2011)**. 49(4):326–346.
- Cunha A, Fernández-Lorente G, Bevilaqua J, Destain J, Paiva L, Freire D, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. “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.
- Dartiguenave C, Bertrand MJ, Waldron KC. “Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking”. Biotechnology. **(2004)**. 37:790–802.
- Davis BG. “Chemical modification of biocatalysts”. Current Opinion in Biotechnology. **(2003)**. 14(4):379–386.
- Delorme V, Dhouib R, Canaan S, Fotiadu F, Carrière F, Cavalier JF. “Effects of Surfactants on Lipase Structure, Activity, and Inhibition”. Pharmaceutical Research. **(2011)**. 28 (8): 1831-1842.
- Dennis KE, Clark DS, Bailey JE, Cho YK, Park YH. “Immobilization of enzymes in porous supports: effects of support-enzyme solution contacting”. Biotechnology and Bioengineering. **(1984)**. 26, 892–900.
- Derewenda U, Brzozowski A, Lawson D, Derewenda, ZS. “Catalysis at the interface: the anatomy of conformational change in a triglyceride lipase”. Biochemistry. **(1992)**. 31: 1532-1541.

- DeSantis G, Jones J. “Chemical modification of enzymes for enhanced functionality”. *Current Opinion in Biotechnology*. **(1999)**. 10: 324-330.
- Desnuelle P. *The Enzymes*. 3rd Editorial Boyer, Academic Press, NY, 575, (1972).
- Diaz-Rodríguez and Davis BG. “Chemical modification in the creation of novel biocatalysts”. *Current Opinion in Chemical Biology*. **(2011)**. 15:211–219.
- Egholm E, Andersen L, Anthonsen T. “Immobilization does not influence the enantioselectivity of CAL-B catalyzed kinetic resolution of secondary alcohols”. *Tetrahedron: Asymmetry*. **(2005)**. 16 (4): 847-850.
- Ericsson J, Kasrayan A, Johansson P, Bergfors T, Mowbray L. “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.
- Escorcía A, Cruz J, Torres R, Ortiz C. “Kinetic resolution of (R,S)-methyl mandelate by immobilized lipase preparations from *Candida antarctica* B”. *Vitae*. **(2011)**. 18 (1): 33-41.
- Fagain CO. “Understanding and increasing protein stability”. *Biochimica et Biophysica Acta*. **(1995)**. 1252: 1-14.
- Feng X, Patterson D, Balaban M, 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.

- Fernández-Lafuente R, Rosell C, Alvaro G, Guisán JM. “Additional stabilization of penicillin G acylase-agarose derivatives by controlled chemical modification with formaldehyde”. *Enzyme and Microbial Technology*. **(1992)**. 14 (6): 489-495.
- Fernandez-Lafuente R, Rosell CM, Rodriguez V, Guisan JM. “Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents”. *Enzyme and Microbial Technology*. **(1995)**. 17:517–523.
- Fernández-Lorente G, Palomo JM, Cabrera Z, Guisán JM, 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, Godoy C, Mendes A, Lopez-Gallego F, Grazu V, de Las Rivas B, et al. “Solid-phase chemical amination of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* to improve its stabilization via covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose”. *Biomacromolecules*. (2008). 9(9):2553–61.
- Fernández-Lorente G, Betancor L, Carrascosa A, Palomo JM, Guisan JM. “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.
- Forde J, Vakurov A, Gibson TD, Millner P, Whelehan M, Marison IW, et al. “Chemical modification and immobilisation of lipase B from *Candida antarctica* onto mesoporous silicates”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **(2010)**. 66 (1-2): 203–209.

- Fuentes M, Segura R, Abian O, Betancor L, Hidalgo A, Mateo C, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. “Determination of protein-protein interactions by intermolecular crosslinking with aldehyde-dextran”. *Proteomics*. **(2004)**. 4: 2602-2607.
- Galvis M, Barbosa O, Torres R, Ortiz C, Fernandez-Lafuente R. “Effect of solid phase chemical modification on the features of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*”. *Process Biochemistry*. **(2012)**. 47:460–466.
- Galvis M, Barbosa O, Ruiz M, Cruz J, Torres R, Ortiz C, Fernandez-Lafuente R. “Chemical amination of lipase B from *Candida antarctica* is an efficient solution for the preparation of crosslinked enzyme aggregates”. *Process Biochemistry*. **(2012)**. 47: 2373–2378.
- Gandhi N. “Applications of lipase”. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **(1997)**. 74 (6): 621-634.
- Geoghegan KF. “Modification of amino groups”. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan*. **(2001)**. Chapter 15.
- Gilis D, Rooman M. “Stability changes upon mutation of solvent accessible residues in proteins evaluated by database derived potentials”. *Journal of Molecular Biology*. **(1996)**. 257:1112–1126.
- Gilis D, Rooman M. “Predicting protein stability changes upon mutation using database derived potentials: solvent accessibility determines the importance of local versus nonlocal interactions along the sequence”. *Journal of Molecular Biology*. **(1997)**. 272: 276–290.

- Godoy C, De las Rivas B, Filice M, Fernández-Lorente G, Guisan JM, Palomo JM. “Enhanced activity of an immobilized lipase promoted by site-directed chemical modification with polymers”. *Process Biochemistry*. **(2010)**. 45 (4): 534-541.
- Gotor-Fernández V, Brieva R, 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-Gallego F, Guisan JM, 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, Cyler M. “Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase”. *Journal of Biological Chemistry*. **(1993)**. 268: 12843–12847.
- Guncheva M, Zhiryakova D. “Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **(2011)**. 68:1–21.
- Gutenwik J, Nilsson B, Axelsson A. “Effect of hindered diffusion on the adsorption of proteins in agarose gel using a pore model”. *Journal of Chromatography A*. **(2004)**. 1048: 161–172.
- Gutierrez-Ayesta, C., Carelli, A., Ferreira, M. “Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids”. *Enzyme and Microbial Technology*. **(2007)**. 41, 35–43.

- Hacking M, Van Rantwijk F, 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.
- Harvey A, Manning D. “Spectrophotometric methods of establishing empirical formulas of colored complexes in solution”. *Journal of the American Chemical Society*. **(1950)**. 72: 4488-4495.
- Hernaiz M, Sanchez-Montero J, Sinisterra J. “Influence of the nature of modifier in the enzymatic activity of chemical modified semipurified lipase from *Candida rugosa*”. *Biotechnology and Bioengineering*. **(1997)**. 55: 252-260.
- Hermanson G. Cleavable reagent systems. In: *Bioconjugates techniques*. Amsterdam: Elsevier Inc. **(2008)**.
- Hernandez K, Garcia-Verdugo E, Porcar R, Fernandez-Lafuente R. “Hydrolysis of triacetin catalyzed by immobilized lipases: Effect of the immobilization protocol and experimental conditions on diacetin yield”. *Enzyme and Microbial Technology*. **(2011)**. 48 (6-7): 510-517.
- Hernandez K, 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.
- Hossain M. Do D. “Determination of intraparticle immobilized enzyme distribution under moderate diffusion conditions”. *Biotechnology and Bioengineering*. **(1992)**. 40, 743–747.

- Illanes A, Cauerhff A, Wilson L, Castro G. "Recent trends in biocatalysis engineering". *Bioresource Technology*. **(2012)**. 115: 48-57.
- Jaeger K, Reetz M. "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology". *Trends in Biotechnology*. **(1998)**. 16 (9): 396-403.
- Juhl P, Doderer K, Hollmann F, Thum O, Pleiss J. "Engineering of *Candida antarctica* lipase B for hydrolysis of bulky carboxylic acid esters". *Journal of Biotechnology*. **(2010)**. 150 (4): 474-480.
- Katchalski-Katzir E. "Immobilized enzymes-learning from past successes and failures". *Trends in Biotechnology*. **(1993)**. 11: 471-478.
- Kaur J, Sharma R. "Directed evolution: an approach to engineer enzymes". *Critical Reviews in Biotechnology*. **(2006)**. 26: 165–199.
- Khajeh K, Ranjbar B, Naderi-manesh H. "Chemical modification of bacterial K-amylases: changes in tertiary structures and the effect of additional calcium". *Enzyme*. **(2001)**. 1548: 229–237.
- Kim M, Kwon J, Kim H, Lee EK. "In vitro refolding of PEGylated lipase". *Journal of Biotechnology*. **(2007)**. 131 (2): 177-179.
- Kirk O, Christensen M. "Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin". *Organic Process Research and Development*. **(2002)**. 6: 446-451.
- Klibanov AM. "Improving enzymes by using them in organic solvents". *Nature*. **(2001)**. 409: 241–246.

- Koderá, Yoh, Matsushima A, Hiroto M, Nishimura H, Ishi A, Ueno T, et al. "Pegylation of proteins and bioactive substances for medical and technical applications". *Science*. (1998). 23(97):1233–1271.
- Kołodziejska R, Karczmarska-Wódzka A, Wolan A, Dramiński M. "*Candida antarctica* lipase B catalyzed enantioselective acylation of pyrimidine acyclonucleoside". *Biocatalysis and Biotransformation*. (2012). 30 (4): 426-430.
- Koops BC, Verheij HM, Slotboom AJ, Egmond MR. "Effect of chemical modification on the activity of lipases in organic solvents". *Enzyme and Microbial Technology*. (1999). 25(7):622–631.
- Kotormán M, Cseri A, Laczkó I, Simon LM. "Stabilization of α -chymotrypsin in aqueous organic solvents by chemical modification with organic acid anhydrides". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2009). 59 (1–3): 153-157.
- Kramer M, Cruz J, fromm P, Rezac M, Czermak P. "Enantioselective transesterification by *Candida antarctica* Lipase B immobilized on fumed silica". *Journal of Biotechnology*. (2010). 150 (1): 80-86.
- Laemmli UK. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*. (1970). 227: 680–685.
- López-Gallego F, Montes T, Fuentes M, Alonso N, Grazu V, Betancor L, et al. "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.
- Lyer PV, Ananthanarayan L. “Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment”. Process Biochemistry. **(2008)**. 43(10):1019–1032.
- Marciello M, Filice M, Palomo JM. “Different strategies to enhance the activity of lipase catalysts”. Catalysis Science & Technology. **(2012)**. 2: 1531–1543.
- Martinelle M, Holmquist M, Hult K. “On the interfacial activation of *Candida Antarctica* lipase A and B as compared with *humicola lanuginose* lipase”. Biochimica et Biophysica Acta. **(1995)**. 1258: 272-276.
- Mateo C, Fernández-Lorente G, Abian O, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. “Multifunctional epoxy supports: A new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage”. Biomacromolecules. **(2000)**. 1: 739-745.
- Mateo C, Abian O, Bernedo M, Cuenca E, Fuentes M, Fernandez-Lorente G, et al. “Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins”. Enzyme and Microbial Technology. **(2005)**. 37:456–462.
- Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. “Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques”. Enzyme and Microbial Technology. **(2007)**. 40: 1451–1463.
- Mendes AA, De Castro HF, De S, Rodrigues D, Adriano WS, Tardioli PW, et al. “Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels:

influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts”. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **(2011)**. 38:1055–1066.

- Meng X, Xu G, Zhou Q, Wu JP, Lang W. “Improvements of lipase performance in high-viscosity system by immobilization onto a novel kind of poly(methylmethacrylate-co-divinylbenzene) encapsulated porous magnetic microsphere carrier”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **(2013)**. 89: 86-92.
- Migneault I, Dartiguenave C. “Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking”. *Biotechniques*. **(2004)**. 37, 790-802.
- Miletić N, Rohandi R, Vuković Z, Nastasović A, Loos K. “Surface modification of macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins for improved *Candida antarctica* lipase B immobilization”. *Reactive and Functional Polymers*. **(2009)**. 69 (1): 68-75.
- Montes T, Grazú V, Lopez-Gallego F, Hermoso J, Guisán JM, Fernandez-Lafuente R. “Chemical modification of protein surfaces to improve their reversible enzyme immobilization on ionic exchangers”. *Biomacromolecules*. **(2006)**. 11:3052–3058.
- Nobel M, Cleasby A, Johnson L, Egmond M, Frenken G. “The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate”. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. **(1993)**. 331: 1265–1269.

- ÓFágáin C. “Enzyme stabilization-Recent experimental progress”. *Enzyme and Microbial Technology*. **(2003)**. 33: 137-149.
- Ortega S, Máximo M, Montiel M, Murcia M, 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, Vicent MJ. “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, Jasmani H. “Production of highly enantioselective (-)-menthyl butyrate using *Candida rugosa* lipase immobilized on epoxy-activated supports. *Food Chemistry*. **(2008)**.106 (2): 437-443.
- Overbeeke P, Govardhan C, Khalaf N, Jongejan J, Heijnen J. “Influence of lid conformation on lipase enantioselectivity”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **(2000)**.10 (4): 385-393.
- Palomo J, Fernández-Lorente G, Mateo C, Fuentes M, Fernández-Lafuente R, Guisan JM. “Modulation of the enantioselectivity of *Candida antarctica* B lipase via conformational engineering: kinetic resolution of (\pm)-hydroxy-phenylacetic acid derivatives”. *Tetrahedron: Asymmetry*. **(2002)**. 13: 1337–1345.
- Palomo J, Fernandez-Lorente G, Mateo C, Ortiz C, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. “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 JM. "Lipases Enantioselectivity Alteration by Immobilization Techniques". *Current Bioactive Compounds*. **(2003)**. 4: 126-138.
- Palomo JM, Segura R, Fernández-Lorente G, Guisan JM, Fernández Lafuente R. "Enzymatic resolution of (\pm)-glycidyl butyrate in aqueous media. Strong modulation of the properties of the lipase from *Rhizopus oryzae* via immobilization techniques". *Tetrahedron: Asymmetry*. **(2004)**. 15: 1157–1161.
- Palomo JM, Fernandez-lorente G, Guisan JM, Fernandez-lafuente R. "Modulation of Immobilized Lipase Enantioselectivity via Chemical Amination". *Advance synthesis and catalysis*. (2007). 349: 1119– 1127.
- Palomo JM. "Lipases Enantioselectivity Alteration by Immobilization Techniques". *Current Bioactive Compounds*. **(2008)**. 4 (2): 126-138.
- Palomo J, Guisan JM. "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, 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.
- Pandey A, Benjamin S, Soccol C, Nigam P, Krieger N, Soccol VT. "The realm of microbial lipases in biotechnologyBiotechnol". *Biotechnology and Applied Biochemistry*. **(1999)**. 29 (2): 119–131.

- Persichetti R, Lalonde J, Govardhan C, Khalaf N, Margolin A. “*Candida rugosa* lipase: enantioselective enhancements in organic solvents”. Tetrahedron Letters. **(1996)**. 37: 6507-6510.
- Pinholt C, Bukrinsky JT, Hostrup S, Frokjaer S, Norde W, Jorgensen L. “Influence of PEGylation with linear and branched PEG chains on the adsorption of glucagon to hydrophobic surfaces”. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V . **(2011)**. 77(1):139–147.
- Pozzo AD, Vanini L, Fagnoni M, Guerrini M, Benedittis AD, Muzzarelli RAA. “Preparation and characterization of poly (ethylene glycol) -crosslinked reacylated chitosans”. Carbohydrates polymers. **(2000)**. 42:201–206.
- Prechter A, Gröger H, Heinrich M. “Synthesis of (S)-(+)-cericlamine through lipase-catalyzed aminolysis of azo acetates”. Organic & Biomolecular Chemistry. (2012). 17 (10): 3384-3387.
- Ray J, Nagy Z, Smith K, Bhaggan K, 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.
- Reetz T. “Lipases as practical biocatalysts”. Biocatalysis and biotransformation. **(2002)** 6: 145-150.
- Rehm S, Trodler P, Pleiss J. “Solvent-induced lid opening in lipases: A molecular dynamics study”. Protein Science. **(2011)**. 19 (11): 2122-2130.

- Reis P, Miller P, Kragel K, Leser M, et al. “Lipases at Interfaces: Unique Interfacial Properties as Globular Proteins”. *Langmuir*. **(2008)**. 24: 6812-6819.
- Reis P, Holmberg K, Watzke H, Leser M, Miller R. “Lipases at interfaces: A review”. *Advances in Colloid and Interface Science*. **(2009)**. 147-148 (C): 237-250.
- Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM. “Chemistry for peptide and protein PEGylation”. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **(2002)**. 54(4):459–476.
- Rocchietti S, Urrutia A, Pregnotato M, Tagliani A, Guisán JM, Fernández-Lafuente R, 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 RC, Godoy C a., Volpato G, Ayub M a. Z, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. “Immobilization–stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Critical role of chemical amination”. *Process Biochemistry*. **(2009)**. 44 (9): 963–968.
- Rodrigues R, Ortiz C, Berenguer A, Torres R, Fernández-Lafuente R. “Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization”. *Chemical Society Reviews*. **(2012)**. DOI: 10.1039/c2cs35231a.
- Rotticci D, Hæffner F, Orrenius C, Norin T, Hult K. “Molecular recognition of sec-alcohol enantiomers by *Candida antarctica* lipase B”. *Journal molecular catalysis B: Enzymatic*. **(1998)**. 5: 1-4.
- Rouhi AM. “Trends in the development of chiral drugs”. *Chemical & Engineering News*. **(2003)**. 81: 45–55.

- Ruiz M, Galvis M, Barbosa O, Ortiz C, Torres R, Fernández-Lafuente R. “Solid-phase modification with succinic polyethyleneglycol of aminated lipase B from *Candida antarctica*: Effect of the immobilization protocol on enzyme catalytic properties”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **(2013)**. 87: 75– 82.
- Sabuquillo P, Reina J, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, 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, Ciuffreda P. “Lipase-Catalyzed Deacylation by Alcoholysis: A Selective, Useful transesterification reaction”. *Current Organic Chemistry*. **(2006)**. 10 (10): 1095-1123.
- Schrag J, Li Y, Cygler M. “The open conformation of a *Pseudomonas* lipase”. *Structure*. **(1997)**. 5, 187-202.
- Secundo F, Carrea G, Tarabiono C, Gatti-Lafranconi P, Brocca S, Lotti M, Jaeger K, Puls M, Eggert T. “The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **(2006)**. 39: 166-170.
- Shandar A, Gromiha MM, Fawareh H, Sarai A. ASAVIEW Database and tool for solvent accessibility representation in proteins. *BMC Bioinformatics*. **(2004)**. 5 [art. 51].
- Sharma D, Sharma B, Shukla AK. “Biotechnological approach of microbial lipase: A review”. *Biotechnology*. **(2011)**. 10(1): 23-40.

- Snyder SL, Sobocinski PZ. "An improved 2,4,6 trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines". *Analytical Biochemistry*. **(1975)**. 64:284–288.
- Son T, Kim D, Kim B, Koo K, Park Y, Kim J, Lim H. Stoichiometric and nonstoichiometric polyelectrolyte complex of chitosan and polyethyleneglycol-monosuccinate: Preparation and characterization. *Journal of applied polymer science*. **(2007)**. 104 (5):3057-3070.
- Svendsen A. "Lipase protein engineering". *Biochimica et Biophysica Acta*. **(2000)**. 2:223-238.
- Terreni M, Pagani G, Ubiali D, Fernández-Lafuente R, Mateo C, Guisán JM. "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.
- Torchilin VP, Maksimenko AV, Smirnov VN, Berezin IV, Martinek K. "Principles of enzyme stabilization V. The possibility of enzyme self stabilization under the action of potentially reversible intramolecular cross-linkages of different length". *Biochimica et Biophysica Acta*. **(1979)**. 568:1–10.
- Turner NJ. "Directed evolution drives the next generation of biocatalysts". *Nature Chemical Biology*. **(2009)**. 5: 567–573.
- Ueji S, Ueda A, Tanaka H, Watanabe K, Okamoto T, Ebara Y. "Chemical modification of lipases with various hydrophobic groups improves their enantioselectivity in hydrolytic reactions". *Biotechnology Letters*. **(2003)**. 25: 83–87.

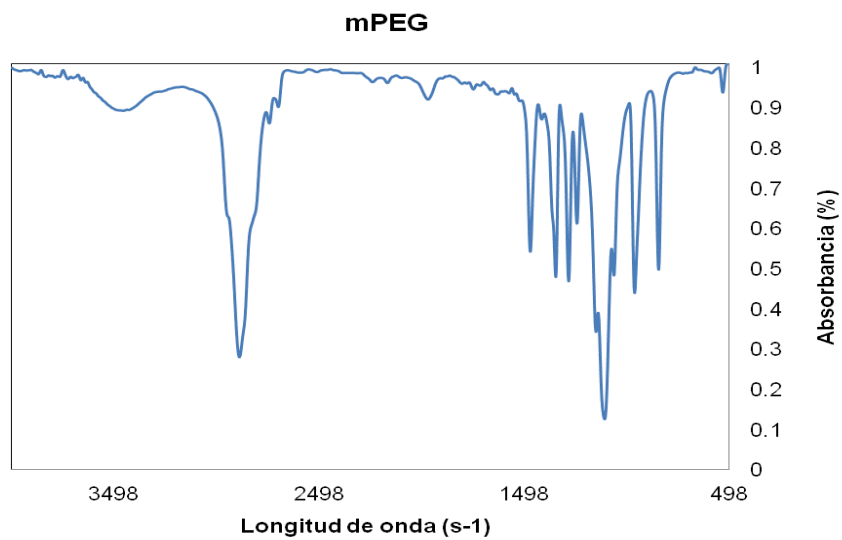
- Uppenberg J, Hansen M, Patkar S, Jones A. “The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*”. *Structure*. **(1994)**. 2: 34-40.
- Van Beilen JB, Li Z, Duetz W, Smits T, Witholt B. “Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment”. *Oil & gas science and technology- revue de le institut francais du petrole*. **(2003)**. 58: 427-440.
- Verger R. “Interfacial activation of lipases: facts and artifacts”. *Trends and biotechnology*. **(1997)**. 15 (1): 32–38.
- Veronese F. “Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions”. *Biomaterials*. **(2001)**. 22: 405-417.
- Volpato G, Filice M, Rodrigues R, Heck J, Guisan JM, Mateo C, Ayub MC. “Modulation of a lipase from *Staphylococcus warneri* EX17 using immobilization techniques”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **(2009)**. 60: 125–132.
- Wang P-Y, Tsai S-W. “Modification of enzyme surface negative charges via covalent immobilization for tailoring the activity and enantioselectivity”. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. **(2009)**. 40(4):364–70.
- Walt DR, Agayn VI. “The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde”. *Trends in Analytical Chemistry*. **(1994)**. 13:425–430.
- Wang J, Do D, Chuah G, Jaenicke S. “Core-Shell Composite as the Racemization Catalyst in the Dynamic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols”. *ChemCatChem*. **(2013)**. 5(1): 247-254.

- Watanabe Y, Nagao T, Shimada Y. "Control of the regiospecificity of *Candida antarctica* lipase by polarity". *New Biotechnology*. **(2009)**. 26 (1-2): 23-28.
- Wehtje E, Costes D, Adlercreutz P. "Enantioselectivity of lipases: effects of water activity". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **(1997)**. 3: 221–230.
- Wheatley JB, Schmidt DE. "Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide-activated supports". *Journal of chromatography. A*. **(1999)**. 849(1):1–12.
- Wessel D, Flügge UI. "A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids". *Analytical Biochemistry*. **(1984)**. 138 (1): 141-143.
- Wilson L, Illanes A, Abián O, Pessela B, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. "Co-aggregation of penicillin G acylase and polyionic polymers: an easy methodology to prepare enzyme biocatalysts stable in organic media". *Biomacromolecules*. **(2004)**. 5: 852-857.
- Wine Y, Cohen-Hadar N, Freeman A, Frolow F. "Elucidation of the mechanism and end products of glutaraldehyde crosslinking reaction by X-ray structure analysis". *Biotechnology and Bioengineering*. **(2007)**. 98: 711–718.
- Woghiren C, Sharma B, Stein S. "Protected thiol-polyethylene glycol: a new activated polymer for reversible protein modification". *Bioconjugate chemistry*. **(1993)**.4(5):314–8.
- Wong SS, Wong L-JC. "Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes". *Enzyme and Microbial Technology*. **(1992)**. 14:866–74.

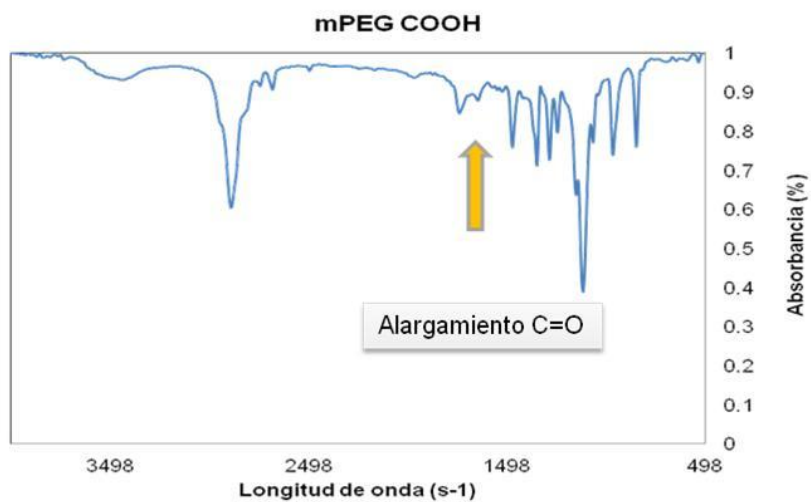
- Xiong J, Huang Y, Zhang H. “Lipase-catalyzed transesterification synthesis of citronellyl acetate in a solvent-free system and its reaction kinetics”. *European Food Research and Technology*. **(2012)**. 235 (5): 907-914.
- Yamashita H, Nakatani H, Tonomura B. “Change of substrate specificity by chemical. Modification of lysine residues of porcine pancreatic α -amylase. *Biochimica et Biophysica Acta*. **(1993)**. 1202:129–34.
- Yang L, Dordick J, Garde S. “Hydration of Enzyme in Nonaqueous Media Is Consistent with Solvent Dependence of Its Activity”. *Biophysical Journal*. **(2004)**. 87 (2): 812-821.
- Yu X, Tan N, Xiao R, Xu Y. “Engineering a Disulfide Bond in the Lid Hinge Region of *Rhizopus chinensis* Lipase: Increased Thermostability and Altered Acyl Chain Length Specificity. *PLoS ONE*. **(2012)**. 7(10): e46388. doi:10.1371/journal.pone.0046388.
- Yu W, Fang M, Tong D, Shao P, Xu T, Zhou CH. “Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hexagonal mesoporous silicas and selective esterification in nonaqueous medium”. *Biochemical Engineering Journal*. **(2013)**. 70: 97-105.

ANEXOS

Anexo A. mPEG

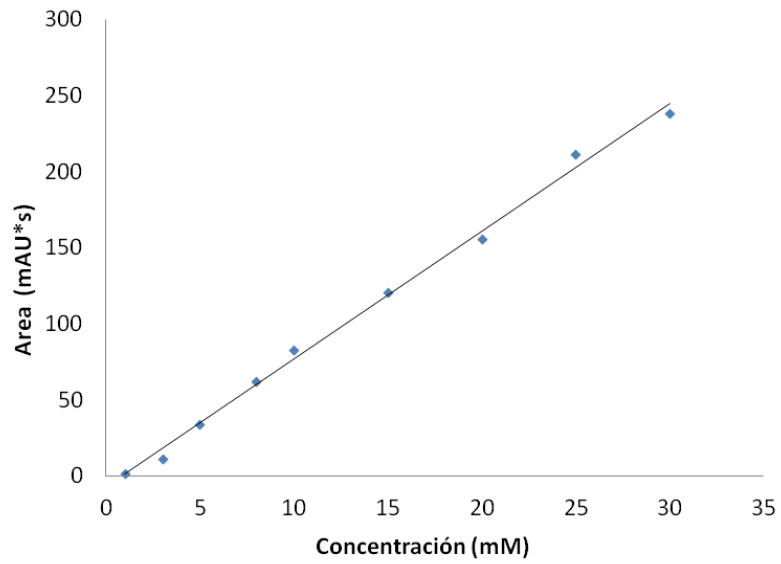


Datos seleccionados para mPEG COOH: IR: ν 3462 (OH), 1753 (vibración del C=O del ácido carboxílico y del ester), 1464 y 1348 (banda del CH₂) 1132 (banda del ester C-O).



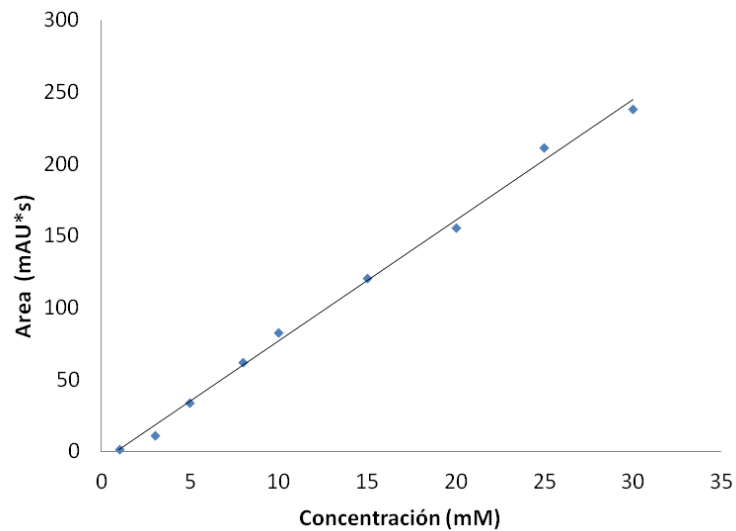
Anexo B. Curva de calibración

Curva calibración R/S-propanolol



Ecuación de la recta $Y = 2838.6 x - 1916.7$

Curva calibración R/S-atenolol



Ecuación de la recta $Y = 167.95 x - 144.8$

Anexo C. La actividad específica de la CAL B se determinó de la siguiente manera:

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

Donde

m = pendiente (mol/L.min)

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

V_t = Volumen total de la reacción

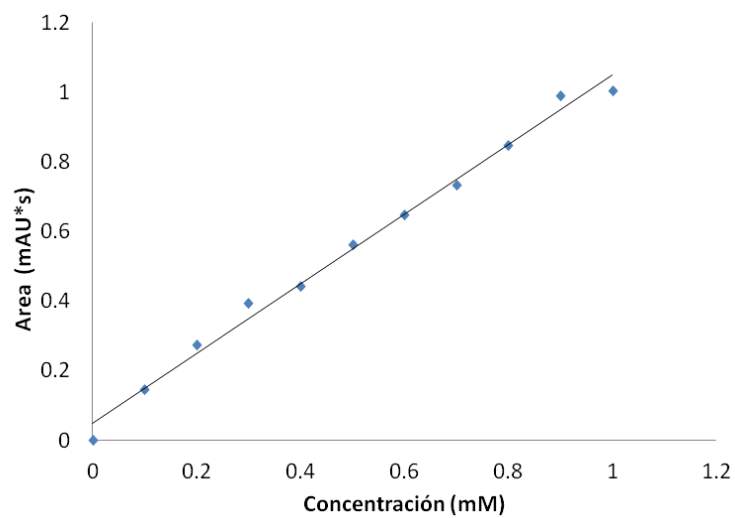
V_m = Volumen de la solución enzimática

FD = Factor de dilución enzimático

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

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

Anexo D. Curva calibración para la determinación de proteína mediante el método del BRADFORD



$Y = 0.9995 x + 0.0497$

DIVULGACIÓN

Publicaciones científicas:

- Barbosa O, Ariza C, Ortiz C, Torres R. “Kinetic resolution of (R/S)-propranolol (1-isopropylamino-3-(1-naphtoxy)-2-propanolol) catalyzed by immobilized preparations of *Candida antarctica* lipase B (CAL-B)”. *New biotechnology*. **(2010)**. 27(6): 844–50.
- Barbosa O, Ortiz C, Torres R, Fernandez-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(3-4): 124–132.
- Barbosa O, Ruiz M, Ortiz C, Fernández M, Torres R, Fernandez-Lafuente R. “Modulation of the properties of immobilized CALB by chemical modification with 2,3,4-trinitrobenzenesulfonate or ethylenediamine. Advantages of using adsorbed lipases on hydrophobic supports”. *Process Biochemistry*. **(2012)**. 47(5): 867–876.
- Barbosa O, Torres R, Ortiz C, Fernandez-Lafuente R. “The slow-down of the CALB immobilization rate permits to control the inter and intra molecular modification produced by glutaraldehyde”. *Process Biochemistry*. (2012). 47: 766–774.
- Barbosa O, Torres R, Ortiz C, 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(8): 1220–1227.

- Galvis M, Barbosa O, Ruiz M, Cruz J, Ortiz C, Torres R, Fernández-Lafuente R. “Chemical amination of lipase B from *Candida antarctica* is an efficient solution for the preparation of crosslinked enzyme aggregates”. *Process Biochemistry*. **(2012)**. 47: 2373–2378.
- Ruiz M, Galvis M, Barbosa O, Ortiz C, Torres R, Fernández-Lafuente R. “Solid-phase modification with succinic polyethyleneglycol of aminated lipase B from *Candida antarctica*: Effect of the immobilization protocol on enzyme catalytic properties”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **(2013)**. 87: 75– 82.

Ponencias en congresos:

Barbosa O, Ortiz C, Torres R “Kinetic resolution of (R/S)-atenolol by immobilized preparations of lipase from *Candida antarctica* B”. En: I Ibero-american congress on Chemistry, Biochemistry and Chemical Engineering. La Habana, Cuba, (2009).

Barbosa O, Torres R, Ortiz C, Fernandez-Lafuente R. “Glutaraldehyde modification of lipase B from *Candida antarctica* immobilized in octyl-agarose”. En: 43rd World Chemistry Congress IUPAC 2011- San Juan, Puerto Rico, (2011).

Barbosa O, Torres R, Ortiz C, Fernandez-Lafuente R, "Regulación de la velocidad de inmovilización de CALB permite el control de la modificación intra e intermolecular producida por glutaraldehído" En: 30º CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUÍMICA - CLAQ 2012. Cancún, Mexico, 2012.

Barbosa O, Ruiz M, Ortiz C, Fernández M, Torres R, Fernandez-Lafuente R. "Modulación de las propiedades de CALB inmovilizada por modificación química con 2,3,4-trinitobencensulfonato y etilendiamina. Las ventajas de usar lipasas adsorbidas sobre soportes hidrofóbicos". En: 30º CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUÍMICA - CLAQ 2012. Cancún, Mexico, 2012.