

El **Dr. Jose V. Sinisterra Gago**, Catedrático de Química Orgánica y Farmacéutica y el **Dr. Andrés R. Alcántara León**, Profesor Titular de Química Orgánica y Farmacéutica del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense,

CERTIFICAN

que la presente Memoria titulada:

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD Y ENANTIOSELECTIVIDAD DE
DERIVADOS DE LA LIPASA DE *Rhizomucor miehei*.**

que presenta **Dña. M^a Trinidad López-Belmonte Coba** para optar al grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizada bajo su dirección y reúne las condiciones necesarias para ser juzgada por el Tribunal correspondiente, autorizando así su presentación.

Para que así conste donde proceda, firman el presente certificado en Madrid,
8 de Febrero de 1996.

Fdo: Dr. J.V. Sinisterra Gago

Fdo: Dr. A.R. Alcántara León

Ponente: Sr. Dr. _____

TRIBUNAL

Presidente: Sr. Dr. Angel Villar _____

Vocal: Sr. Dr. Carmen Alencar _____

Vocal: Sr. Dr. Cesar Giménez _____

Vocal: Sr. Dr. Gabriel Herrera-Requena _____

Secretario: Sr. Dr. Emilio Llana _____

La **Dra. M^a Carmen Avedaño López**, Catedrática y Directora del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense,

CERTIFICA

que **Dña. M^a Trinidad López-Belmonte Coba** ha realizado en los laboratorios de este Departamento, bajo la dirección del Dr. José Vicente Sinisterra Gago y del Dr. Andrés R. Alcántara León, el presente trabajo para optar al grado de Doctor en Farmacia, con el título:

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD Y ENANTIOSELECTIVIDAD DE
DERIVADOS DE LA LIPASA DE *Rhizomucor miehei*.**

y para que así conste donde proceda, firma el presente certificado en Madrid, 8 de Febrero de 1996.

Fdo: Dra. M^a Carmen Avedaño López



Memoria presentada para optar

al grado de Doctor en Farmacia por:

M^a TRINIDAD LOPEZ-BELMONTE COBA

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD Y
ENANTIOSELECTIVIDAD DE DERIVADOS DE LA
LIPASA DE *Rhizomucor miehei*.**

Directores: **Dr. José Vicente Sinisterra Gago**

Dr. Andrés R. Alcántara León

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

Facultad de Farmacia

Universidad Complutense

Madrid, Marzo de 1996

Quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento:

A mi padre Dr. Franciso López-Belmonte Rubira, Profesor Titular del Departamento de Biología Vegetal II, porque esta Tesis Doctoral es el resultado de sus buenos y sabios consejos.

Al Dr. José V. Sinisterra, Catedrático del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica por la dirección de esta Tesis Doctoral y por haberme permitido trabajar en su grupo de trabajo.

Al Dr. Andrés R. Alcántara León, Profesor Titular del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica por la dirección de este trabajo, así como por su apoyo, dedicación, amistad y valiosísimas enseñanzas que me ha transmitido durante estos años de trabajo.

A mi buena amiga Dra. M^a José Hemáiz con la que he compartido las prisas y agobios; pero con la que sobre todo, he pasado muy buenos ratos y, a mis amigos y compañeros de laboratorio, Dr. Miguel Arroyo, Dr. Jose M^a Moreno y próximamente también doctor Carlos Torres con los que he compartido muchas horas de trabajo, pero también de risas y sobre todo compañerismo, vagando por diversos cuartitos hasta llegar al flamante laboratorio nº 6 del Departamento.

Al Dr. Burguillo del Departamento de Fisico-Química de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca por el análisis por HPLC de la enantioselectividad de las muestras de Ketoprofeno.

Al Dr. R. García-Cañero, del Departamento de Bioquímica Analítica del Hospital Puerta de Hierro, que tan amablemente realizó las electroforesis recogidas en esta Memoria y que me permitieron visualizar los resultados obtenidos.

A Victor Jiménez del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia, que siempre estuvo dispuesto a ayudarme y permitirme utilizar algunas técnicas de su laboratorio.

A Isidoro Fuentes y Sonia Chamorro por su valiosa colaboración, durante las últimas fases de este trabajo

A todos mis compañeros del Departamento, especialmente a Chami, Isabel, Sonia, Ana, M^aAngeles, Raquel, Angel, Marisol, César, Fernando, etc. y a M^a Eugenia Peñas que siempre estuvo dispuesta a ayudarme.

A mis padres, hermanos y a Rodrigo, por sus ánimos y cariño.

Finalmente, agradezco a la Universidad Complutense la concesión de la Beca Pre-Doctoral de Formación de Profesorado y Personal Investigador por el apoyo económico prestado durante el período 1992-1995.

a mis padres

INDICE

I.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

<u>II.- INTRODUCCION</u>	7
II.1.- ENZIMAS	7
II.1.1.- Características como biocatalizadores	10
II.1.2.- Evolución histórica	10
II.1.3.- Clasificación y Nomenclatura	11
II.2.- LIPASAS	11
II.2.1.- Definición	11
II.2.2.- Distribución en la naturaleza	13
II.2.3.- Características de las lipasas microbianas	14
II.2.4.- Mecanismo de acción	16
II.2.5.- Actividad catalítica de las lipasas	23
II.2.5.a.- Cinética enzimática	
II.2.5.b.- Estereoselectividad de las lipasas	
II.2.6.- Actividad de las lipasas en medio orgánico	33
II.2.7.- Aplicaciones de las lipasas	42
II.3.- LIPASA DE <i>Rhizomucor miehei</i>	54
II.3.1.- <i>Rhizomucor miehei</i>	54
II.3.2.- Obtención de la lipasa de <i>Rh.miehei</i>	56
II.3.3.- Estructura de la lipasa de <i>Rh.miehei</i>	61
II.4.- INMOVILIZACION DE ENZIMAS	91
II.4.1.- Definición	91
II.4.2.- Ventajas de la inmovilización	92
II.4.3.- Inconvenientes de la inmovilización	94
II.4.5.- Métodos de inmovilización	95
II.4.6.- Inmovilización por adsorción iónica	99
II.4.7.- Inmovilización por unión covalente	99

II.5.- ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS	101
II.5.1.- Patología de la inflamación	101
II.5.2.- Antiinflamatorios no esteroideos	102
<u>III.- PARTE EXPERIMENTAL</u>	111
III.1.- MATERIALES	113
III.1.1.- Reactivos	113
III.1.2.- Enzimas	116
III.1.2.a.- Lipasa cruda de <i>Rh.miehei</i>	
III.1.2.b.- Lipasa inmovilizada de <i>R.miehei</i>	
III.1.3.- Sustratos	118
III.2.- PROGRAMAS DE CALCULO	119
III.2.1.- SIMFIT	119
III.2.2.- HIPERCHEM	121
III.3.- CARACTERIZACION DE LA LIPASA DE <i>Rh.miehei</i>	123
III.3.1.- Determinación de la concentración de proteínas	123
III.3.1.a.- Método del Biuret	
III.3.1.b.- Método de Bradford	
III.3.2.- Determinación de la actividad esterásica	128
III.3.3.- Determinación de la actividad lipásica	131
III.3.3.a.- Hidrólisis de aceite de oliva	
III.3.3.a.1.- Método A	
III.3.3.a.2.- Método B	
III.3.3.b.- Hidrólisis de tributirina	
III.3.4.- Desorción por abrasión de Lipozyme® IM20	136
III.3.5.- Electroforesis	136
III.4.- SEMIPURIFICACION DE LA LIPASA CRUDA DE <i>Rh.miehei</i>	
III.4.1.- Semipurificación de enzimas en función	
de su peso molecular	137
III.4.1.a.- Ultrafiltración.	137
III.4.1.b.- Diálisis	138

III.4.2.- Separación de proteínas por diferencia de solubilidad	140
III.5.- INMOVILIZACION DE LA LIPASA DE <i>Rh.miehei</i>	146
III.5.1.- Activación del soporte	146
III.5.2.- Inmovilización de la lipasa de <i>Rh.miehei</i>	147
III.5.3.- Estudios de estabilidad térmica de los derivados inmovilizados	
III.6.- SINTESIS QUIMICA DE ESTERES BUTILICOS DE ACIDOS (R,S) 2-ARILPROPIONICOS	150
III.6.1.- Ester butílico de Ibuprofeno	150
III.6.2.- (R,S) 2-fenilpropionato de butilo	151
III.6.3.- Ester butílico de Ketoprofeno	152
III.6.4.- Ester butílico de Naproxeno	152
III.7.- HIDROLISIS ENZIMATICA DE ESTERES	153
III.7.1.- método A.	153
III.7.2.- método B.	154
III.7.3.- Asilamiento del producto de reacción	154
III.8.- SINTESIS ENZIMATICA DE ESTERES	155
III.8.1.- Estudio de las variables continuas o estructurales	155
III.8.2.- Estudio de las variables discontinuas o de operación. Diseño estadístico de Experimentos.	156
III.8.3.- Métodos de cuantificación de las reacciones	157
III.8.3.a.- Determinación rendimiento de reacción	157
III.8.3.b.- Determinación del exceso enantiomérico	160
III.9.- ISOTERMAS DE ADSORCION DE AGUA	161
III.9.1.- calibración del aparato de actividad de agua.	162
III.9.2.- Preparación de las muestras	162
III.9.3.- Isotermas de absorción	162
III.9.4.- Ajuste de la curva de la isoterma	163

IV.- RESULTADOS Y DISCUSION	165
IV.1.- CARACTERIZACION DE LA LIPASA DE <i>Rh.miehei</i>	167
IV.1.1.- Determinación de la concentración de proteínas	167
IV.1.2.- Determinación de la actividad esterásica	169
IV.1.3.- Determinación de la actividad lipásica	173
IV.1.3.A.-Hidrólisis de aceite de oliva	173
IV.1.3.b.- Hidrólisis de tributirina	178
IV.2.- SEMIPURIFICACION DE LA LIPASA DE <i>Rh.miehei</i>	183
IV.2.1.-Ultrafiltración	183
IV.2.2.- Diálisis y centrifugación	185
IV.2.3.- Semipurificación de proteínas por precipitación tras la adición de sulfato amónico	190
IV.2.4.- Conclusiones obtenidas tras la semipurificación	206
IV.3.- INMOVILIZACION DE LA LIPASA DE <i>Rh.miehei</i>	209
IV.3.1.- Seguimiento del proceso de inmovilización	211
IV.3.2.- Comparación de los derivados inmovilizados de la lipasa de <i>Rh.miehei</i>	213
IV.3.3.- Estudio de la estabilidad térmica de la lipasa de <i>Rh.miehei</i> inmovilizada	216
IV.3.4.- Inmovilización de la lipasa de <i>Rh.miehei</i> semipurificada	219
IV.4.- RESOLUCION ENANTIOSELECTIVA DE AINEs	228
IV.4.1.- Enantioselectividad de la lipasa de <i>Rh.miehei</i>	228
IV.5.- HIDROLISIS ENANTIOSELECTIVA DE ESTERES.	229
IV.6.- SINTESIS ENANTIOSELECTIVA DE ESTERES	234
IV.6.1.- Estudio de las variables de operación Diseño estadístico de Experimentos.	234
IV.6.1.a.- Influencia de la cantidad de enzima	242
IV.6.1.b.- Influencia del tiempo de reacción	246
IV.6.1.c.- Influencia de la temperatura	249

IV.6.1.d.- Influencia de la cantidad de agua en el medio	253
IV.6.1.e.- Influencia de la relación molar de sustratos (ácido/alcohol)	263
IV.6.2.- Estudio de las variables estructurales	274
IV.6.2.a.- Disolvente orgánico	275
IV.6.2.b.- Alcoholes	281
IV.6.2.c.- Acidos (R,S) 2-arilpropiónicos	285
IV.6.3.- Estudio de la actividad de lipasa de <i>Rh.miehei</i> semipurificada e inmovilizada sobre sílice	308
<u>V.- CONCLUSIONES</u>	313
<u>VI.- BIBLIOGRAFIA</u>	319

ABREVIATURAS

TCT → 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina

AAS

DMF → N,N-dimetilformamida

BSA → albúmina de suero bovino

pNPA → acetato de *para*-nitrofenilo

V_0 → velocidad inicial

ee → exceso enantiomérico

E → coeficiente de enantioselectividad

FE → factor de enantioselectividad

pI → punto isoeléctrico

rend → rendimiento en éster (reacción síntesis ésteres) y rendimiento en ácido liberado (reacción hidrólisis de ésteres)

a_w → actividad de agua

AINEs → antiinflamatorios no esteroideos

Abreviaturas de derivados de la lipasa de *Rh.miehei*

SIL-SP → lipasa semipurificada por precipitación con un 50% de saturación de sulfato amónico y posteriormente inmovilizada por enlace covalente sobre sílice.

SP → lipasa semipurificada por precipitación con un 50% de saturación de sulfato amónico

SIL-C → lipasa inmovilizada por enlace covalente sobre sílice

D → lipasa dializada

DC → lipasa dializada y centrifugada

DCC → lipasa dializada y centrifugada dos veces

IM20 → derivado comercial (Lipozyme® IM20) de lipasa inmovilizada por adsorción sobre una resina de intercambio aniónico

RML-A → isoenzima A de la lipasa de *Rh.miehei*

RML-B → isoenzima B de la lipasa de *Rh.miehei*

rRML → lipasa de *Rh.miehei* recombinante

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

La presente Tesis Doctoral se encuadra dentro de la línea del Proyecto de Investigación: "Resolución de racematos de ácidos 2-aril-propiónicos con actividad antiinflamatoria usando lipasas inmovilizadas como biocatalizadores". (Código PB 90-0010C02-01).

Los **objetivos planteados en la presente Tesis Doctoral** fueron los siguientes:

1).- Caracterización de la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada por adsorción sobre una resina de intercambio aniónico, comercializadas por el laboratorio Novo-Nordisk como Lipozyme® 10000L y Lipozyme® IM20, respectivamente. Para llevar a cabo dicha caracterización se pusieron a punto diversas metodologías de:

- * determinación de concentración de proteínas
- * determinación de actividad esterásica
- * determinación de actividad lipásica

2).- Semipurificación de la lipasa cruda de *Rh.miehei*, para lo cual se analizaron diversas metodologías de separación de proteínas basadas en:

- * la diferencia de tamaño molecular
- * la diferencia de solubilidad

3).- Inmovilización de la lipasa de *Rh.miehei* por enlace covalente con sílice, previamente activada vía 2,4,6,-tricloro-1,3,5-triazina.

- * inmovilización de la lipasa de *Rh.miehei* cruda y semipurificada.
- * estudio comparativo de este nuevo derivado inmovilizado y el derivado comercial (IM20).

4).- Desarrollo y puesta a punto de un método de resolución enantioselectiva de mezclas racémicas de ácidos (R,S) 2-arilpropiónicos que pueda ser escalado a nivel industrial. Para ello se han estudiado las variables estructurales y operacionales que intervienen en la resolución enantioselectiva de estos fármacos, catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada por adsorción.

5).- Estudio de la actividad enzimática de los derivados de la lipasa de *Rh.miehei* obtenidos en la presente Tesis Doctoral, tras la semipurificación de esta enzima por diversos métodos e inmovilización por enlace covalente con sílice, utilizándose posteriormente en la resolución enantioselectiva de AINEs derivados del ácido (R,S) 2-arilpropiónico.

INTRODUCCION

II.1.- ENZIMAS

II.1.1.- CARACTERÍSTICAS COMO BIOCATALIZADORES

Las enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas. Su interés reside en las siguientes características principales:

1).- Las enzimas son biocatalizadores y por tanto, **disminuyen la energía de activación** necesaria para que las reacciones se desarrollen, aumentando su velocidad. Asimismo se ha comprobado que la enzimas presentan una actividad catalítica más eficaz que los catalizadores inorgánicos; por ejemplo, la energía necesaria para que se produzca la reacción de descomposición del agua oxigenada en agua y oxígeno es de 75 KJ/mol en ausencia de catalizador, 50KJ/mol en presencia de platino y disminuye hasta 8KJ/mol en presencia de la peroxidasa (antiguamente denominada catalasa). Este efecto tan drástico sobre la energía de activación en presencia de enzimas se debe a la formación de un complejo intermedio enzima-sustrato, que posteriormente se transforma en producto y enzima.

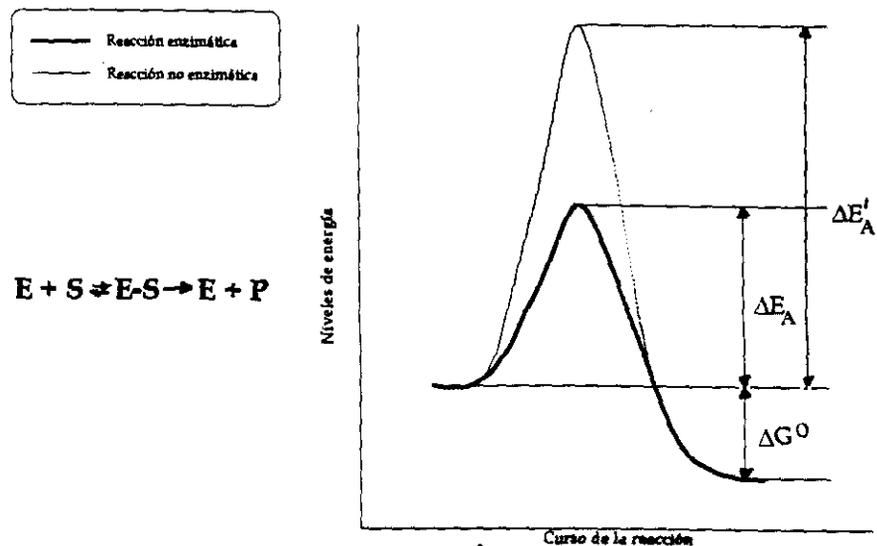


Figura 1: Efecto de la catálisis enzimática sobre la energía de activación. ΔE_A es la energía de activación para una reacción catalizada por una enzima, mientras que $\Delta E'_A$ es la energía de una reacción no enzimática. ΔG^0 es la energía libre de reacción.

2). Las enzimas **son selectivas**, tanto de la reacción que catalizan, como de los sustratos que reconocen. Además, presentan un elevado grado de estereo y regioselectividad (en general, aceleran más el proceso con un isómero que con el otro, lo cual constituye una gran ventaja frente a los catalizadores químicos clásicos). La selectividad de las enzimas se debe a la formación del complejo enzima-sustrato, el cual produce en una pequeña región de la enzima denominada centro activo, el cual suele estar localizado en un hueco o cavidad dentro de la estructura terciaria de la enzima. La especificidad enzimática reside en las características de ese centro activo (dimensiones, topología, alineamiento de grupos contraiónicos y regiones hidrófobas), que condicionan las características que debe reunir un determinado sustrato para acoplarse en esa región enzimática. Solamente un número reducido de aminoácidos están implicados en la catálisis enzimática, los cuales no se localizan consecutivamente en la cadena polipeptídica, sino que se encuentran juntos tras el proceso de plegamiento enzimático.

Se han propuesto numerosos modelos para explicar la selectividad de las enzimas para un determinado sustrato. El modelo de "la llave y la cerradura" ¹, que da una versión rígida de las enzimas ha sido superado por el modelo de "el acoplamiento o encaje inducido" ². Según este modelo el sustrato induce la orientación de los residuos en el centro activo para que se unan al centro de fijación y se desarrolle la reacción. La selectividad de las enzimas es la base de sus aplicaciones en Síntesis Orgánica, que permite llevar a cabo, por ejemplo, transformaciones muy selectivas con estructuras quirales y polifuncionales.

3).- Las enzimas **pueden ser objeto de regulación**; es decir, su actividad catalítica puede estar determinada por la concentración de sustratos, productos y otras sustancias químicas presentes en el medio; las cuales pueden producir, tanto su activación como su inhibición.

4).- Las enzimas **se degradan en condiciones relativamente suaves**; por lo que requieren una manipulación más delicada que los catalizadores metálicos. Las enzimas se pueden desnaturalizar por diversos mecanismos como: la acción de proteasas, presentes

como agentes contaminantes en las preparaciones enzimáticas; los cambios bruscos de las condiciones del medio que pueden alterar la conformación enzimática; contaminaciones microbianas; procesos de autooxidación, etc..

Algunos de los principales inconvenientes que presentan los procesos catalizados por enzimas (la inestabilidad, el precio elevado y la especificidad respecto a sustrato) se han podido superar mediante diferentes procedimientos como:

a).- La transformación estereoselectiva de algunos sustratos, que conduce a la obtención de intermedios o productos de gran interés en Síntesis Orgánica.

b).- El desarrollo de técnicas (como la inmovilización enzimática) que permiten mejorar la estabilidad de las enzimas y facilitan su posterior recuperación y reutilización³, siendo posible la utilización de estas enzimas como biocatalizadores en procesos industriales.

c).- Los avances en Biología Molecular y las nuevas tecnologías del ADN recombinante han permitido la manipulación del material genético, el aislamiento de genes y su expresión con el fin de obtener determinadas enzimas en grandes cantidades⁴. Como consecuencia, el precio de las enzimas ha descendido espectacularmente. Estas técnicas también han permitido la modificación selectiva de algunas propiedades enzimáticas.

d).- La limitación debida a la insolubilidad de determinados sustratos en agua, lo que impedía el desarrollo de las reacciones enzimáticas, ha sido superada mediante la utilización de sistemas bifásicos⁵ o la adición de pequeñas concentraciones de cosolventes orgánicos (etilenglicol, glicerol o dimetilsulfóxido), sin alterar las propiedades y características del biocatalizador⁶.

II.2.- EVOLUCION HISTORICA

El la denominación de enzima ("en la levadura") no se empleó hasta 1877, pero mucho antes ya se sopechaba que ciertos catalizadores biológicos intervenían en la fermentación del azúcar para formar etanol, de ahí el nombre inicial de fermentos.

La primera teoría general sobre la catálisis química fue publicada en 1835 por J.J. Berzelius, el cual incluía en su artículo un ejemplo de lo que ahora se conoce como enzima, la diastasa de malta, y señalaba que la hidrólisis del almidón catalizada por la diastasa era más eficaz que la catalizada por ácido sulfúrico.

Luis Pasteur en 1860 reconoció que la fermentación era catalizada por enzimas y en 1897 E. Büchner consiguió extraer de las células de la levadura las enzimas que catalizan la fermentación alcohólica. Sin embargo, fue en 1926 cuando J.B. Summer aisló por primera vez una enzima en forma cristalina; se trataba de una ureasa aislada de extractos de la alubia *Cannavalia enzyformis*. Summer observó que estos cristales estaban constituidos por estructuras protéicas y llegó a la conclusión de que las enzimas eran proteínas. No obstante, sus puntos de vista no fueron aceptados hasta que Northrop entre 1930-36 aisló la pepsina, tripsina y quimotripsina cristalizadas.

II.3.- CLASIFICACION Y NOMENCLATURA

Las enzimas se han clasificado sistemáticamente en seis clases principales⁷, cada una de las cuales se divide a su vez en subclases, de acuerdo con el tipo de reacción catalizada por cada una de ellas (Tabla 1).

Cada enzima se designa por un nombre recomendado, generalmente corto y apropiado para su uso habitual; por un nombre sistemático que identifica la reacción que cataliza y por un número de clasificación (ECC) que se emplea cuando se precisa la identificación inequívoca de la enzima (Tabla 1).

La enzima objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral es la lipasa de *Rhizomucor miehei*; la cual viene definida por el número E.C. 3.1.1.3, donde E.C. son las abreviaturas de Comisión de Enzimas, la primera cifra «3» representa el nombre de la clase (hidrolasa), la segunda cifra «1» representa a la subclase (enlace que hidroliza, esterasa), la tercera cifra «1» a la sub-subclase (esterasa que reconoce ésteres del glicerol) y la cuarta cifra «3» designa a la glicerol-éster-hidrolasa de ácidos de cadena larga.

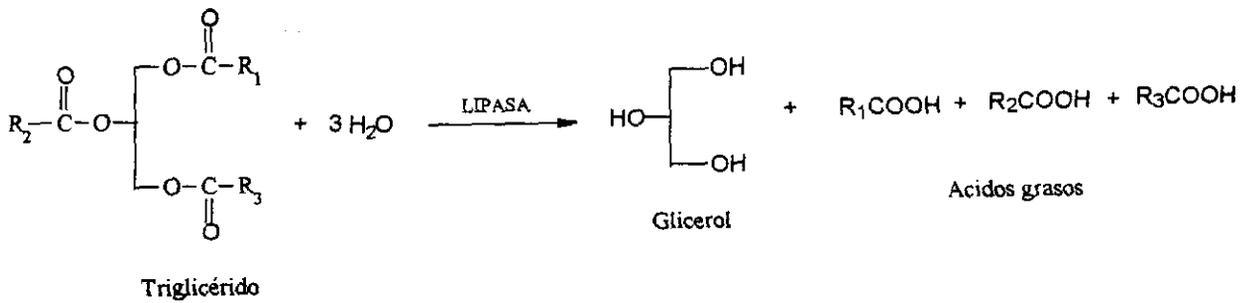
Tabla 1: Clasificación internacional de las enzimas (denominación de clases, números de código y tipos de reacciones)

1-OXIDO REDUCTASAS: <i>(Reacciones de óxido-reducción)</i>	1.1-Actúan sobre alcoholes >-OH 1.2-Actúan sobre cetonas >C=O 1.3- Actuan Sobre alquenos >C=CH- 1.4 Actúan sobre grupos amino -NH ₂ 1.5- Actúan sobre grupos imino =NH
2-TRANSFERASAS: <i>(Transferencia de grupos funcionales)</i>	2.1-Grupos de un átomo de C 2.2-Grupos carbonilo 2.4-Grupos glucosilo 2.5-Grupos fosfato 2.6-Grupos que contienen azufre
3-HIDROLASAS: <i>(Reacciones de hidrólisis)</i>	3.1-Esteres 3.2-Enlaces glucosídicos 3.3-Enlaces peptídicos 3.4-Otros enlaces C-N 3.5-Anhidridos de ácido
4-LIASAS: <i>(Adición a dobles enlaces)</i>	4.1- >C=C< 4.2- >C=O 4.3- >C=N-
5-ISOMERASAS <i>(Reacciones de isomerización)</i>	5.1-Racemasas
6-LIGASAS: <i>(Formación de enlaces con escisión de ATP)</i>	6.1- Entre átomos de C y O 6.2- Entre átomos de C y S 6.3- Entre átomos de C y N 6.4- Entre átomos de C y C

II.2.- LIPASAS

II.2.1.- DEFINICION

Las lipasas (glicerol éster hidrolasas, EC 3.1.1.3) son un conjunto de enzimas cuya función biológica es catalizar la hidrólisis de triglicéridos de grasas animales y aceites vegetales para dar lugar a ácidos grasos y glicerol. Esta hidrólisis tiene lugar a través de los pasos intermedios de formación de diacilglicéridos y monoacilglicéridos^{8,9}.



Esquema 1: Hidrólisis de triglicéridos, función biológica de las lipasas

Actualmente, podemos decir que esta definición se encuentra incompleta debido a que:

a).- No tiene en cuenta la especificidad de este grupo de enzimas, ya que a esta definición solo se ajustan las lipasas no específicas, que hidrolizan al triglicérido en sus tres posiciones, como la lipasa de *Staphylococcus aureus*¹⁰. Pero hay otras lipasas específicas que hidrolizan determinadas posiciones del éster del glicerol, como las pertenecientes al género *Rhizopus*, que sólo hidrolizan las posiciones 1 y 3¹¹, o la isoenzima B de la lipasa de *Geotrichum candidum*¹², que muestra preferencia por la posición 2.

b).- Mediante el control de las condiciones de reacción, las lipasas son capaces de llevar a cabo la reacción inversa a la de su función biológica, es decir, sintetizar ésteres mediante procesos de esterificación, transesterificación e interesterificación¹³.

c).- Por último, son capaces de hidrolizar otro tipo de enlaces como amido y tioéster^{14,15}.

Debido a la baja solubilidad de sus sustratos naturales las lipasas se caracterizan por su capacidad de catalizar la hidrólisis de los enlaces ésteres en la interfase entre una fase lipóide (que constituye el sustrato) y una fase acuosa donde está la enzima disuelta. Esta propiedad las diferencia de las esterasas (carboxil éster hidrolasas, EC 3.1.1.1), que hidrolizan preferentemente ésteres solubles en agua¹⁶. Por tanto, la diferencia entre ambos tipos de enzimas radica en el estado físico del sustrato; así, las lipasas son capaces de hidrolizar micelas y emulsiones, mientras que las esterasas trabajan en un medio homogéneo, donde se

encuentran disueltos tanto la enzima como el sustrato.

II.2.2.- DISTRIBUCION EN LA NATURALEZA

Las lipasas son enzimas muy abundantes en la naturaleza. En función de su origen natural podemos dividir las en tres grupos¹⁷:

II.2.2.a.- Lipasas animales

Las lipasas se encuentran en todos los niveles del reino animal; desde los invertebrados hasta los mamíferos, pasando por los reptiles¹⁸ y participan en varios niveles del metabolismo de lípidos como la digestión de la grasa, y la absorción, reconstitución y metabolismo de lipoproteínas¹⁹.

En los mamíferos se pueden distinguir tres subgrupos de enzimas:

- 1).- las lipasas descargadas en el tracto digestivo por órganos especializados²⁰
- 2).- las lipasas tisulares, tales como las presentes en el corazón, arterias, cerebro, músculo, tejido sérico, tejido adiposo, etc²¹
- 3).- las lipasas presentes en la leche²².

II.2.2.b.- Lipasas vegetales

Las lipasas en los vegetales se acumulan principalmente en los tejidos de reserva de energía como las semillas y frutos²³. Cuando una semilla germina presenta una alta actividad lipolítica, para obtener la energía necesaria para llevar a cabo dicho proceso; por ello las enzimas mejor caracterizadas de este grupo se encuentran en el maíz²⁴, fruto de palma²⁵, trigo²⁶ y avena²⁷.

II.2.2.c.- Lipasas microbianas

Las lipasas de mayor interés industrial son las producidas por microorganismos (bacterias, hongos y levaduras)^{28,29}. La mayor parte de ellas son lipasas extracelulares, que tras ser sintetizadas por el microorganismo son excretadas al medio de cultivo a través de la membrana celular. A ellas nos referimos a continuación con más detalle.

II.2.3.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS LIPASAS

MICROBIANAS.

Las lipasas microbianas son glicoproteínas ácidas que contienen entre un 3% y un 15% de hidratos de carbono, siendo la manosa la hexosa mas abundante. Su peso molecular está comprendido entre 20.000 y 60.000 Daltons. Las características concretas de cada enzima (especificidad de sustrato y condiciones de reacción) son diferentes, dependiendo del microorganismo del que han sido aisladas. También es frecuente que un mismo microorganismo produzca varias isoenzimas, que en algunos casos actúan sobre sustratos diferentes, pero que con frecuencia presentan distintos parámetros cinéticos y condiciones óptimas de reacción. El origen de esta multiplicidad se relaciona con tres causas:

- a).- Biosíntesis de varias proteínas codificadas por genes diferentes³⁰
- b).- Biosíntesis de una secuencia de aminoácidos que sufre posteriormente modificaciones post-traduccionales: asociación con lípidos³¹, proteólisis parcial³² y deglicosilación parcial³³.
- c).- Fenómenos de asociación-disociación de subunidades protéicas iguales o diferentes.

Se han encontrado un gran número de microorganismos que producen dos isoenzimas. Las características de cada isoenzima son distintas, ya que actúan sobre sustratos diferentes y muestran, en muchos casos, parámetros cinéticos y condiciones óptimas de reacción diferentes.

En la bibliografía consultada aparecen numerosos ejemplos de lipasas de origen microbiano, tales como: *Penicillium camembertii*³³, *Aspergillus niger*³⁴, *Geotrichum candidum*³⁰, *Mucor lipolyticus*³⁵, *Rhizomucor miehei*³⁶ o *Cromobacterium viscosum*³⁷.

II.2.3.a.- Condiciones de reacción.

Temperatura

Las lipasas son activas dentro de un amplio intervalo de temperaturas, que va de -20 a 45 °C; aunque el intervalo óptimo se sitúa entre 30 y 45 °C¹⁰. Por encima de 40 °C la mayoría de las lipasas pierden su actividad; pero existen lipasas termoestables, como las

producidas por *Aspergillus niger*, *Rhizopus japonicus*, *Cromobacterium viscosum* y *Geotrichum candidum*, que son estables con temperaturas superiores a 50 °C¹¹.

Excepcionalmente, la lipasa producida por *Pseudomonas nitroductans* es estable a 70 °C³⁸.

pH

En cuanto al pH, las lipasas son activas en amplios intervalos de pH, centrándose el pH óptimo entre 6,0 y 8,0¹⁰. No obstante, la lipasa producida por *Staphylococcus hycus* presenta como pH óptimo 9,0³² y la lipasa de *Bacillus* tiene como pH óptimo 3,8³⁹.

II.2.3.b.- Especificidad

En función de su especificidad posicional las lipasas se clasifican en dos grupos:

Lipasas no específicas

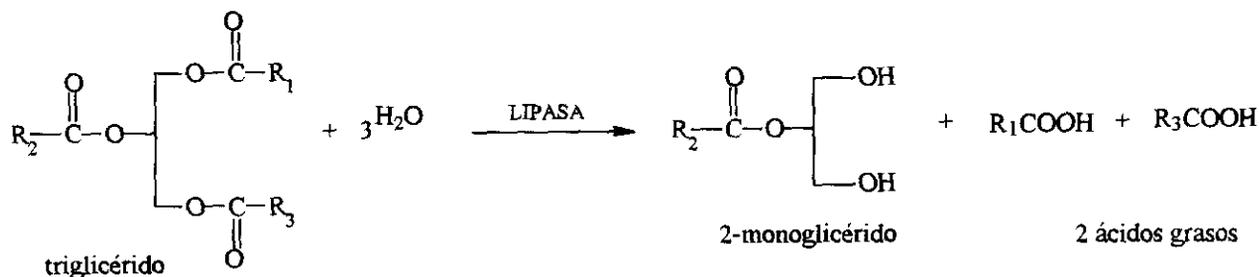
No presentan una especificidad particular por las posiciones 1,2 ó 3 de los triglicéridos, según se refleja en el esquema anteriormente citado. Producen ácidos grasos y glicerol, no apareciendo los diglicéridos como intermedios de la reacción.

A este grupo pertenecen las lipasas producidas por *Candida rugosa*, *Geotrichum candidum*, *Staphylococcus aureus*, *Penicillium cyclopium*, etc.

Lipasas específicas

Actúan específicamente sobre las posiciones 1 y 3 del glicerol. A este grupo pertenecen las lipasas de *Aspergillus liger*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus javanicus*, *Pseudomonas species* y *Rhizomucor miehei*³⁸⁻⁴¹ (Esquema 2)

También existen lipasas específicas de la posición 2 del esqueleto de glicerol de la trioleína, como la isoenzima de la lipasa de *Geotrichum candidum*⁴², pero son mucho más escasas.



Esquema 2: Mecanismo general de acción de las lipasas 1,3-específicas

Dentro de los factores que influyen en la especificidad de las lipasas microbianas, la longitud de la cadena y el grado de insaturación de los ácidos grasos del triglicérido son los dos factores más importantes, pudiéndose encontrar numerosos ejemplos en la bibliografía. La lipasa de *Penicillium cyclopium* es más activa frente a triglicéridos con ácidos de cadenas cortas que con los de larga cadena; la lipasa de *Aspergillus niger* y *Rhizopus delemar* muestran más actividad hacia triglicéridos con ácidos de longitud de cadena media⁴³. Alford⁴⁴ y Jensen⁴⁵ han encontrado que la lipasa de *Geotrichum candidum* es altamente específica para ácidos grasos con un doble enlace cis en C₉.

II.2.4.- MECANISMO DE ACCION.

Las lipasas son enzimas lipolíticas activas únicamente cuando están adsorbidas sobre una interfase oleo-acuosa; fenómeno que recibe el nombre de "activación interfacial"⁴⁶. Esta es la diferencia fundamental con las esterasas, que catalizan el mismo tipo de reacciones, pero en medio acuoso. Por esta razón la utilidad principal de las lipasas reside en la posibilidad de actuar sobre sustratos apolares, que solo son solubles en medios hidrófobos.

II.2.4.a.- Activación interfacial

Durante décadas se ha discutido mucho acerca de las bases moleculares del fenómeno de la activación interfacial de las lipasas. Algunas de estas teorías destacan el papel fundamental del sustrato, mientras que otras se centran en la importancia de la enzima.

Según las denominadas *teorías del sustrato* se enfatiza el papel de la concentración y organización del sustrato en la interfase oleo-acuosa. En este sentido, Brockman⁴⁷ señala el

papel fundamental de la agregación del sustrato en la interfase cuando se lleva a cabo la hidrólisis de un sustrato insoluble en agua. Otros autores apuntan el hecho de la diferente orientación/conformación de las moléculas de sustrato en la interfase, lo cual favorecería un ataque más eficaz del enzima. Brockerhoff y Jensen⁴⁸ proponen una teoría basada en la deshidratación del sustrato al unirse en la interfase facilitándose así la formación del complejo enzima-sustrato.

Por el contrario, los defensores de la denominada teoría de la enzima, postulada principalmente por Desnuelle y cols. en 1960⁴⁹, sugieren que durante la adsorción de la lipasa sobre la interfase oleo-acuosa se producen una serie de cambios conformacionales en la lipasa. Los recientes estudios por mecánica molecular y por rayos-x de la lipasa de *Rh.miehei* y por rayos-X de su estructura cristalizada apoyan la segunda teoría, ya que se ha comprobado la existencia de una "tapadera" hidrofóba constituida por un segmento helicoidal de la cadena protéica, que cubre el centro activo de la lipasa y que tras la adsorción de la enzima a la interfase oleo-acuosa, se abre dejando libre el acceso del sustrato hasta el centro activo de la enzima, donde se sitúa la triada catalítica y el agujero oxianiónico, formado también tras la adsorción enzimática. Estas zonas estructurales se describirán con detalle más adelante (ver II.3.3.).

En 1960, Desnuelle y cols.⁴⁹ sugirieron un modelo bidimensional para explicar la actividad lipolítica de las lipasas, que supuso un importante avance en el conocimiento del mecanismo de acción de estas enzimas interfaciales. Dicho modelo sugiere que las lipasas, que son enzimas hidrosolubles, para fijarse a la superficie interfacial deben sufrir un cambio conformacional previo. Este cambio conformacional ha sido observado en la fosfolipasa A₂ y en lipasas de hongos⁵⁰⁻⁵² (Figura 2)

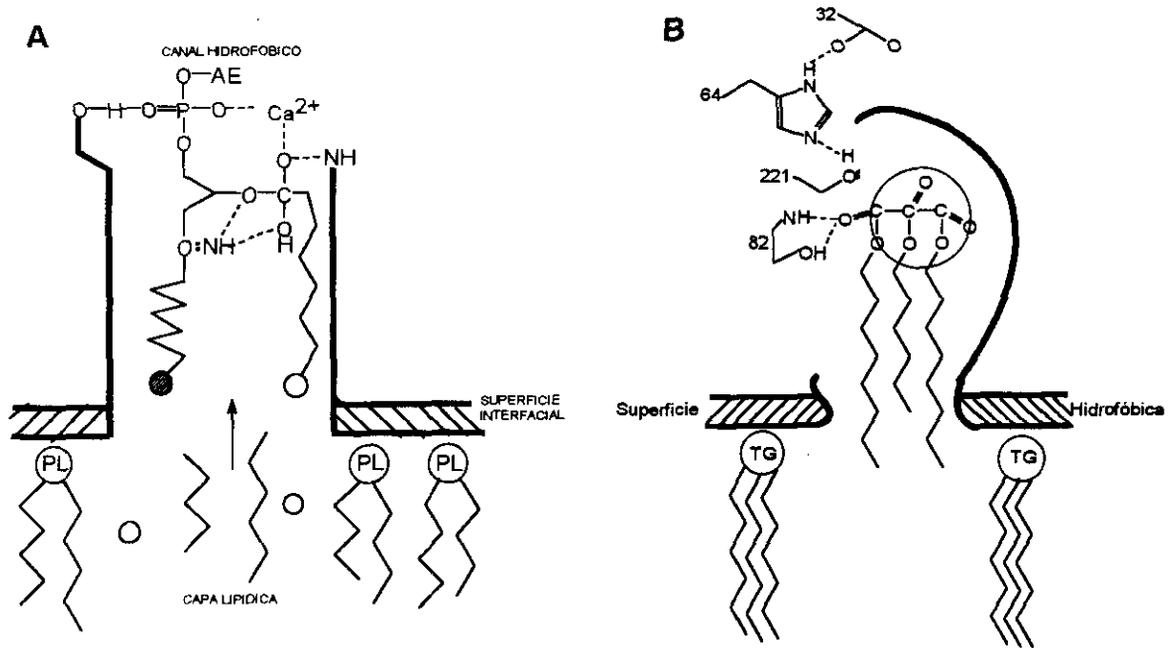


Figura 2: Esquema del mecanismo de acción de la fosfolipasa A₂ (a) y de una lipasa (b).

Otra hipótesis, basada también en la modificación enzimática, consiste en la dimerización de la enzima inducida por la agregación del sustrato. Verger y cols.⁵³ postularon un modelo según el cual la enzima se une a la interfase por un lugar adicional topográfica y funcionalmente diferente al lugar de actuación, estabilizando las interacciones con la interfase (Figura 3).

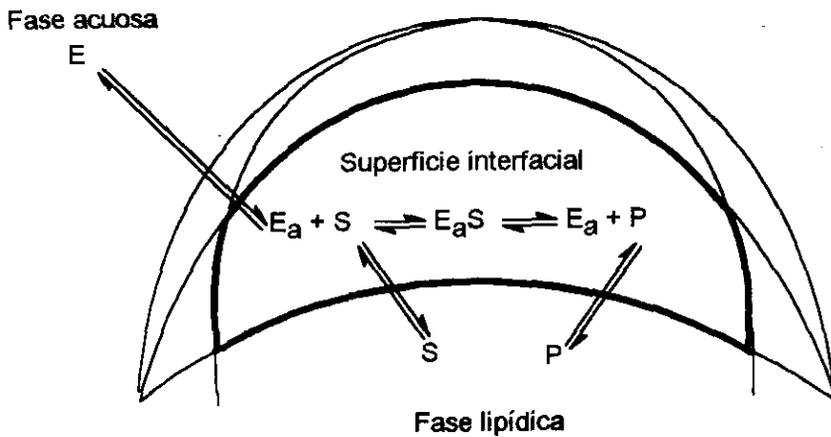


Figura 3: Modelo esquemático de lipólisis⁵⁴.

Un factor característico de la lipólisis es que la concentración y orientación de la enzima y del sustrato en una fase superficial viene determinada por fuerzas distintas de las que intervendrían en el caso de interacción directa entre la enzima y el sustrato en la catálisis homogénea.

Como se deduce de la Figura 3, el microentorno de la enzima es muy diferente del macroentorno. La monocapa donde se encuentra la lipasa viene determinada por la naturaleza del sustrato, por la presencia o no de agentes emulsificantes, etc., y en general, por el coeficiente de reparto del sustrato en la bicapa. Por otro lado, hay enzimas que necesitan la presencia de cofactores, como la colipasa, que sirven de unión entre la proteína y la interfase. Todos estos factores añaden nuevas dificultades al estudio de la actividad enzimática, por lo que en la bibliografía se recogen numerosos trabajos acerca de las características fisico-químicas de la interfase y de los factores que determinan el área interfacial de las emulsiones^{47,54-56}.

La principal utilidad de la emulsión es la creación de grandes áreas interfaciales que contienen el sustrato apolar en un volumen relativamente pequeño. Ello permite la adsorción de todas las moléculas de enzima en la interfase y la máxima velocidad de reacción⁴⁷. La diferente distribución del tamaño de la emulsión puede modificar el comportamiento cinético de la enzima. Por otro lado, también es importante utilizar emulsificantes apropiados que disminuyan la tensión interfacial e impidan fenómenos de agregación, que provocan la disminución del área superficial⁴⁷.

Actualmente se recomienda el uso de monocapas lipídicas frente a los sistemas clásicos, ya que presentan una serie de ventajas⁵⁷:

- a).- Son muy sensibles por lo que se necesitan cantidades mínimas de lípidos para realizar medidas cinéticas.

- b).- Permiten el control de parámetros físico-químicos característicos de la película monomolecular, aportando información sobre el curso de la reacción.

- c).- Se mejora la "calidad de la interfase", que depende de la naturaleza de los lípidos que forman la monocapa, orientación y conformación de las moléculas, carga, viscosidad, etc.

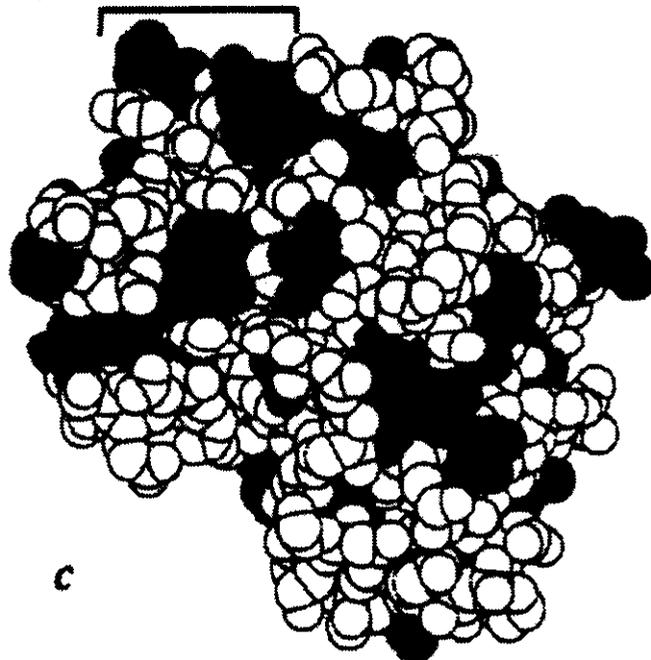
II.2.4.b.- Mecanismo de reacción de la lipólisis y síntesis de ésteres

Las lipasas presentan un elemento estructural diferenciador que no se conoce en otro grupo de enzimas. Dicho elemento estructural es una "tapadera" formada por una porción helicoidal de la cadena polipeptídica, que se coloca sobre el centro activo de la enzima cuando está inactiva. Tras la activación interfacial, expuesta en la sección anterior, esta "tapadera" se abre, dejando libre el acceso hasta el centro activo. Además, se forma un agujero oxianiónico donde se unirá el sustrato y será, también, el encargado de estabilizar el intermedio tetraédrico de la reacción.

El centro activo de las lipasas está constituido por una triada catalítica (Ser...His...Asp), que constituye otro elemento común (junto con el agujero oxianiónico) entre las lipasas y las serínproteasas⁵⁸. Por lo que, el mecanismo de acción de las lipasas es muy semejante al de las serínproteasas.

Para el estudio del mecanismo de acción de las lipasas se analizó la estructura de los complejos covalentes cristalizados de la lipasa de *Rh.miehei* con sus inhibidores (fosfonato de *p*-nitrofenilo y *n*-hexilfosfonato de etilo)^{59,60} y se observó que la apertura de la tapadera, al unirse con el inhibidor, provoca una alteración total en la superficie de acceso al centro activo de la enzima, de forma que ésta zona adquiere un carácter más hidrófobo, favoreciendo la interacción de los sustratos (Figura 4).

Hydrophobic surface



Hydrophobic surface

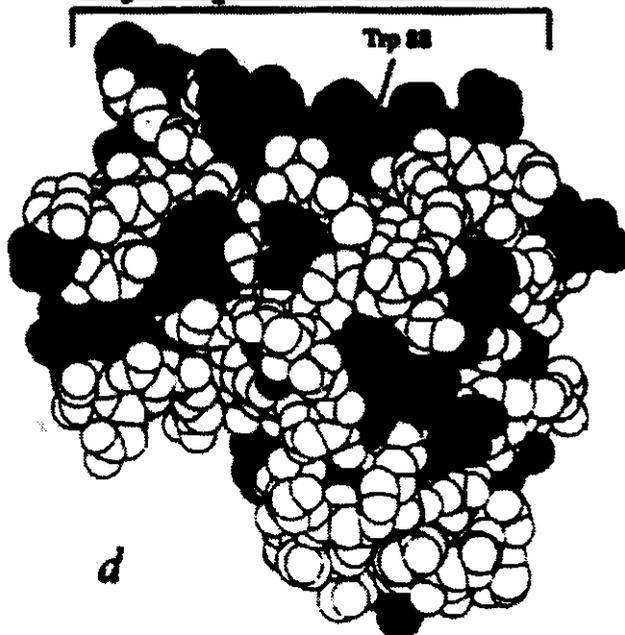


Figura 4: Activación interfacial de la lipasa de *Rh.miehei*. (C) enzima nativa; (D) complejo enzima-inhibidor.

El mecanismo de acción de las lipasas en la reacción de síntesis o hidrólisis de ésteres, en función del tipo de sustratos, es muy similar al de las serín-proteasas⁶¹, como se muestra a continuación en la Figura 5.

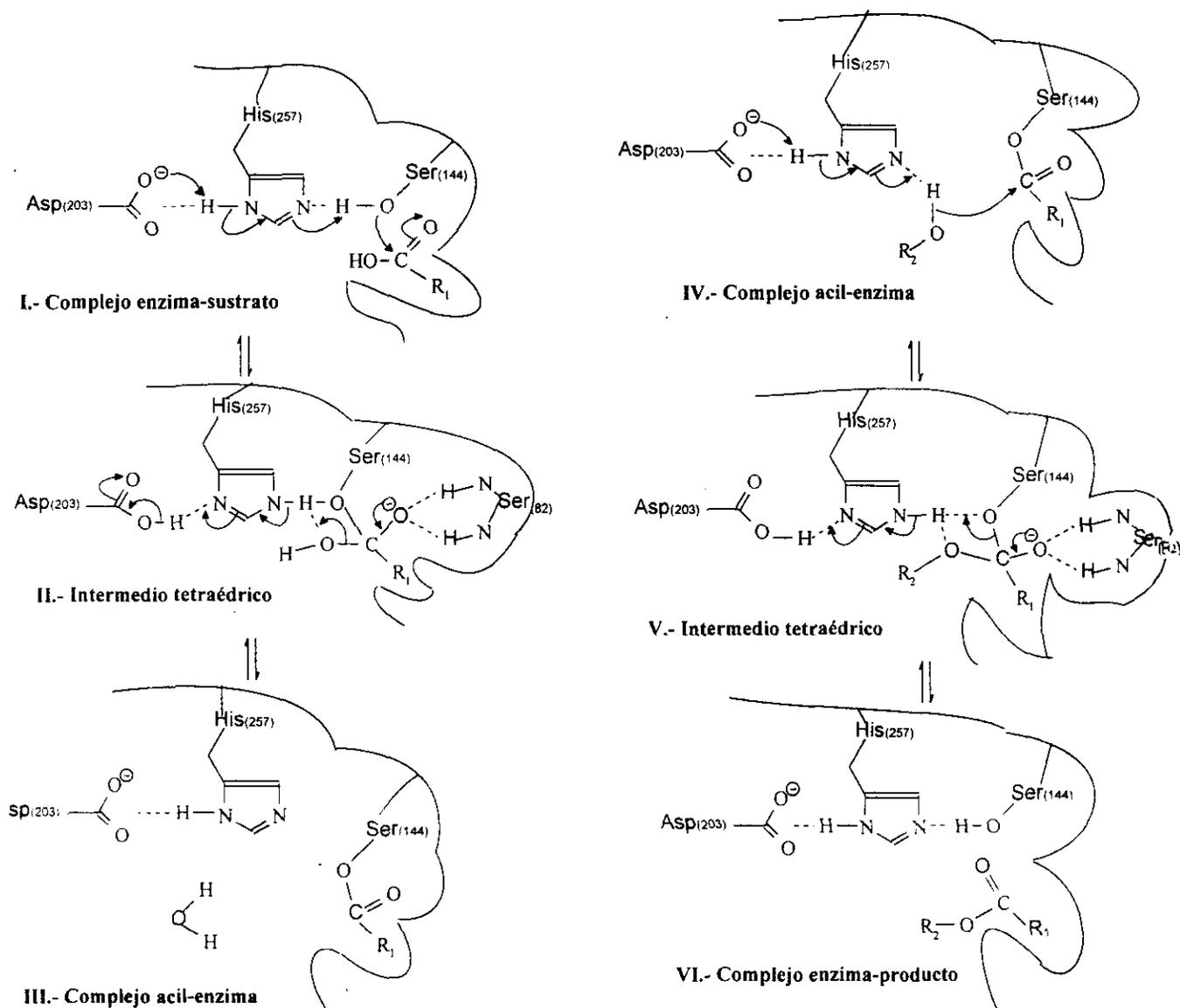


Figura 5: Mecanismo general de síntesis de ésteres catalizada por lipasas. La numeración de los residuos corresponde a la lipasa de *Rh.miehei*⁶²

Durante la reacción de síntesis de ésteres, el carbono carbonílico del ácido sufre el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo del residuo de Serina de la triada catalítica, que ha sido previamente activado a través de una red de puentes de hidrógeno con los otros dos elementos de la triada (Histidina y Aspártico) (Figura 5). A continuación, se forma un intermedio tetraédrico que se estabiliza por puentes de hidrógeno con el residuo Serina-82 que forma parte del agujero oxianiónico. Este frágil intermedio se rompe liberando una molécula de agua y dando lugar al complejo acil-enzima, el cual es atacado por el alcohol que hay en el medio de reacción. De esta manera, se forma otro intermedio tetraédrico, también estabilizado por el agujero oxianiónico, que se rompe liberando el éster correspondiente. Al mismo tiempo, la triada catalítica de la enzima recupera su estructura original. La velocidad de reacción de todo este proceso está determinada por la primera fase, formación del complejo acil-enzima, ya que es la más lenta.

En las reacciones de hidrólisis de ésteres el mecanismo de acción es el mismo; la única variación reside en la naturaleza de los sustratos. El primer donador de acilo es un éster, en lugar de ácido; tras la rotura del primer intermedio tetraédrico se libera un resto alcohólico y el ataque nucleofílico final lo realiza una molécula de agua, en lugar de una molécula de alcohol.

II.2.5.- ACTIVIDAD CATALITICA DE LAS LIPASAS

Un catalizador se define como toda aquella sustancia que acelera la velocidad de una reacción y puede ser recuperado, sin sufrir cambios químicos, al final de la reacción.

En los organismos vivos las enzimas actúan como catalizadores de la mayoría de las reacciones biológicas; pero actualmente las enzimas también se utilizan como catalizadores de reacciones de síntesis química orgánica, permitiendo la realización de reacciones que antes presentaban muchos inconvenientes o eran inviables (*ver II.2.6.*).

II.2.5.a.- Cinética enzimática

II.2.5.a.1.- Determinación de la actividad catalítica de una enzima.

La actividad catalítica de una enzima se expresa como milimoles de sustrato transformados por unidad de tiempo.

Cuando se quiere comparar la actividad de distintas enzimas, como catalizadores de una determinada reacción, se utiliza el término de **actividad específica** que equivale a la actividad catalítica por miligramo de proteína.

El valor de actividad catalítica se calcula a través de la pendiente de la recta obtenida al representar la velocidad de reacción, expresada en milimoles de sustrato transformados por minuto, frente a la cantidad de proteína, expresada en miligramos. Para poder comparar la actividad enzimática específica de distintas enzimas es necesario que la determinación de su concentración proteica se haya realizado siguiendo la misma metodología, ya que los resultados obtenidos, por ejemplo según el método del biuret y el método de Bradford son diferentes.

II.2.5.a.2.- Estudio del mecanismo de acción de una enzima

El mecanismo de acción de una determinada enzima depende del tipo de reacción que catalice. En la presente Tesis Doctoral se analizaron dos mecanismos de acción para la lipasa de *Rh.miehei*:

a) reacciones de hidrólisis con un solo sustrato (determinación de la actividad lipásica y esterásica), según cinética Michaelis-Menten.

b) reacciones de síntesis de ésteres con dos sustratos, según cinéticas de tipo ping-pong bi-bi.

Cinéticas de Michaelis-Menten.

Los principios generales de la cinética de las reacciones químicas son aplicables a las reacciones catalizadas por enzimas, pero éstas muestran un rasgo característico y que solo se da en las reacciones biocatalizadas: la saturación con el sustrato.

Las reacciones más sencillas de la cinética enzimática, son aquellas en las que un sustrato S es convertido en un producto P por medio de una reacción catalizada por una

enzima E, sin que se produzcan inhibiciones por producto u otras sustancias. Estas reacciones siguen el siguiente esquema:



La cinética de estas reacciones enzimáticas sigue el modelo descrito por Leonor Michaelis y Maud Menten en 1913⁶³. Según este modelo cinético, para una determinada concentración de enzima, la velocidad de reacción aumenta proporcionalmente con la concentración de sustrato [S], hasta ocupar todos los centros activos de la enzima, alcanzando entonces un estado de saturación enzimática y máxima actividad con una velocidad constante (V_{max}) (Figura 6)

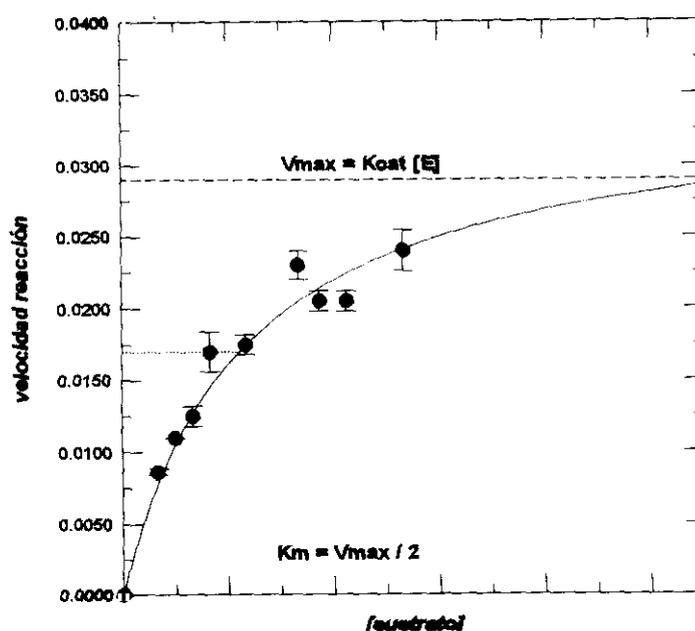


Figura 6: Representación de Michaelis-Menten. Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente.

Este proceso se expresa cuantitativamente a través de la ecuación de Michaelis-Menten, ecuación de velocidad para las reacciones catalizadas por enzimas que sólo actúan sobre un sustrato y que es considerada como la ecuación básica de la cinética enzimática.

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad [1]$$

Constante de Michaelis (K_M): es la concentración de sustrato a la cual se alcanza una velocidad de reacción que equivale a la mitad de la velocidad máxima, es decir, es la concentración de sustrato a la cual la mitad de los centros activos de la enzima están ocupados. K_M indica el grado de estabilidad del complejo enzima-sustrato; ya que un valor elevado de K_M indica que la unión del complejo es muy débil.

Velocidad máxima (V_{\max}): Indica la velocidad máxima de reacción, que se obtiene cuando todos los centros activos de la enzima están saturados de sustrato.

Para analizar la actividad catalítica de una enzima se utiliza el **número de recambio (k_{cat})**, parámetro que relaciona la velocidad máxima de reacción con la concentración inicial de enzima y que, representa el número máximo de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo por una molécula de enzima cuando está totalmente saturada de sustrato.

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\max}}{[E_0]} \quad [2]$$

Con el fin de transformar la ecuación de Michaelis-Menten en una representación lineal se siguen los métodos de: Lineweaver-Burk⁶⁴ y Eadie-Hofstee^{65,66}.

* **Método de Lineweaver-Burk:** Se representan el inverso de la velocidad de reacción ($1/v$) frente al inverso de la concentración de sustrato ($1/s$). El punto de corte de la recta con el eje "y" representa la inversa del valor de V_{\max} y el valor de la pendiente equivale al cociente K_M/V_{\max} .

* *Método de Eadie-Hofstee*: Se representa la velocidad frente al cociente $V/[S]$. El valor de la pendiente equivale a $-K_M$ y el punto de corte con el eje de ordenadas equivale a V_{max}

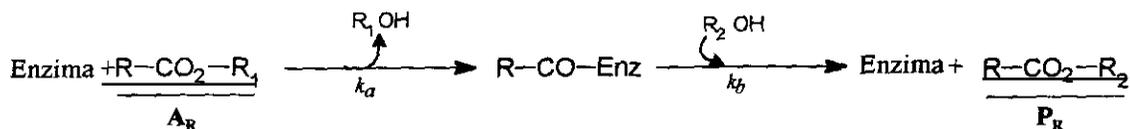
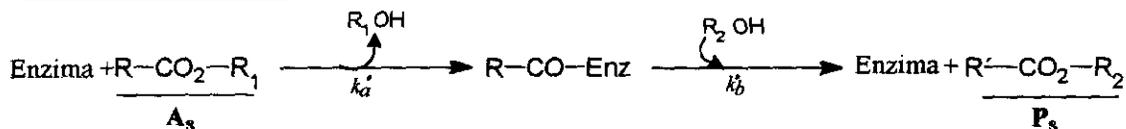
La representación de Eadie-Hofstee se considera más precisa^{67,68}, por lo que va a ser la representación lineal utilizada en la presente Tesis Doctoral.

Cinéticas multisustrato

La mayoría de las enzimas suelen utilizar más de un sustrato para llevar a cabo su acción catalítica. Muchos de los principios aplicados para enzimas que actúan sobre un solo sustrato pueden aplicarse también a sistemas multisustrato. No obstante, en la mayoría de estos casos se suele observar un comportamiento michaeliano cuando la concentración de un sustrato se mantiene constante y solamente varía el segundo sustrato. Según la terminología comunmente aceptada, se consideran reacciones secuenciales aquellas en las que todos los sustratos se unen a la enzima antes de que se forme el primer producto de la reacción. Estos mecanismos secuenciales se llaman ordenados si los sustratos se unen a la enzima y los productos se liberan en un orden obligatorio. Por su parte, un mecanismo al azar implica la no obligatoriedad en el orden de combinación o liberación. Por otra parte, las reacciones en las cuales unos o más productos se liberan antes de que todos los sustratos se añadan se denomina ping-pong o de doble desplazamiento y el término "uni-uni" o "bi-bi" hace referencia al número de sustratos presentes.

La cinética de las reacciones de transferencia de acilo catalizadas por lipasas en medio orgánico, que pueden concluir en la síntesis o hidrólisis de ésteres en función de la naturaleza de los sustratos, corresponde a un mecanismo de reacción tipo ping-pong bi-bi⁶⁹, que es una variación del modelo de Michaelis-Menten, definido para reacciones con dos sustratos y que se desarrollan en dos etapas.

El mecanismo general de reacción de las lipasas se basa en la formación de un complejo acil-enzima con el primer sustrato racémico (A_R y A_S), que posteriormente sufre un ataque nucleofílico por el segundo sustrato (B) formándose los productos de la reacción (P_R y P_S). Este mecanismo de acción se representó en el apartado anterior (*ver II.2.4.b.; Figura 5*), pero se puede esquematizar para un sustrato racémico según el siguiente modelo:

reacción enantiómero R**reacción enantiómero S****Esquema 3:** Mecanismo de reacción tipo ping-pong bi bi para sustratos quirales

En las reacciones de **síntesis de ésteres** los sustratos A_R y A_S son los enantiómeros de un ácido y $R_2\text{-OH}$ es un alcohol, mientras que los productos P_R y P_S son los enantiómeros del éster formado y $R_1\text{-OH}$ es el agua liberada en la reacción

En el esquema 3, para la reacción de síntesis de ésteres, k_a , k_b , k'_a y k'_b son constantes netas de velocidad⁷⁰. Cinéticamente, k_a y k'_a equivalen a K_{cat}/K_m de ambos enantiómeros (A_R y A_S) y k_b , k'_b representan la constante de unión y el rendimiento catalítico de cada complejo diastereoisomérico acil-enzima respecto al nucleófilo aquiral.

Los valores de las constantes de velocidad k_a y k_b corresponden a las siguientes ecuaciones 3 y 4 respectivamente.

$$k_a = \exp(-\Delta G_{T1}/RT) \quad [3]$$

$$k_b = \exp(-\Delta G_{T2}/RT) \quad [4]$$

donde T_1 y T_2 indican los estados de transición.

Si la velocidad de reacción del enantiómero A_R es v_{AR} y la velocidad del enantiómero rival A_S es v_{AS} , entonces aplicando el método de constantes netas de velocidad de Cleland⁷¹ se obtienen las siguientes reacciones:

$$[\text{Enz}]_0/v_{AR} = 1/k_a[A_R] + (1/k_b + k'_a[A_S]/k_a k'_b[A_R]) \cdot 1/[\text{ROH}] \quad [5]$$

$$[\text{Enz}]_0/v_{AS} = 1/k'_a[A_S] + (1/k'_b + k_a[A_R]/k'_a k_b[A_S]) \cdot 1/[\text{ROH}] \quad [6]$$

Estas ecuaciones indican claramente que la discriminación entre dos sustratos competidores depende de la secuencia completa de la reacción.

En las **reacciones de hidrólisis de ésteres** los sustratos (A_R y A_S) son los enantiómeros de un éster quiral y $R_2\text{-OH}$ es un alcohol; mientras que los productos (P_R y P_S) son los enantiómeros del ácido liberado. En estas reacciones se produce una pérdida parcial de especificidad debido a la elevada concentración de agua (55,5M), que es el disolvente de la reacción. Como consecuencia, el segundo término de las ecuaciones 5 y 6, que representa los pasos que siguen a la fase irreversible de la reacción, son anulados, quedando esas ecuaciones reducidas a las siguientes ecuaciones, para las reacciones de hidrólisis:

$$[\text{Enz}]_0/v_A = 1/k_a[A] \quad [7]$$

$$[\text{Enz}]_0/v_B = 1/k'_a[B] \quad [8]$$

Combinando las dos ecuaciones 7 y 8 se obtiene la ecuación 9⁷².

$$v_A/v_B = (k_a/k'_a) \cdot ([A]/[B]) \quad [9]$$

Esta ecuación 9 indica que en las reacciones hidrolíticas, la enantioselectividad depende únicamente de la secuencia catalítica que conduce hasta el primer paso reversible. Esta diferencia en cuanto a la enantioselectividad de los dos procesos explica por qué, en algunos casos, la enantioselectividad del proceso es mayor en las reacciones de esterificación en disolventes orgánicos que en reacciones de hidrólisis en medio acuoso⁷³⁻⁷⁵.

Las reacciones que siguen un mecanismo de tipo ping-pong dan lugar a gráficas de Lineweaver-Burk paralelas para diferentes concentraciones del segundo sustrato, mientras que V_{\max} y la K_M del primer sustrato también aumentan (Figura 7).

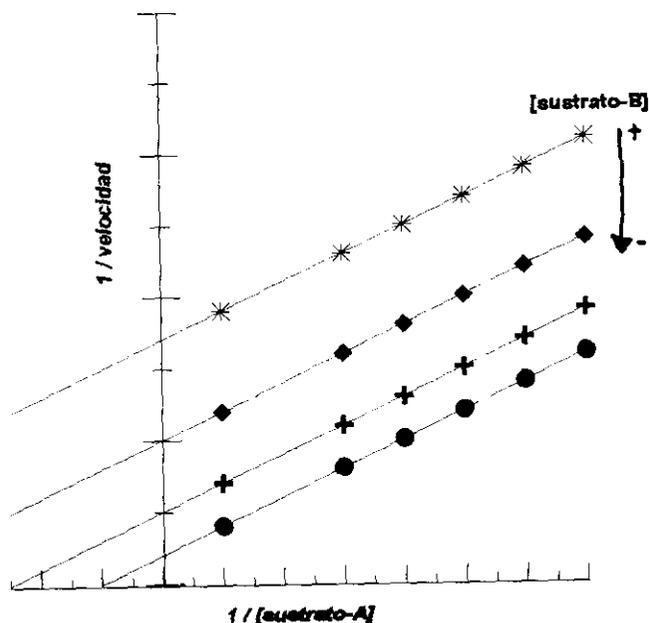


Figura 7: Gráficas de Lineweaver-Burk paralelas, características de la cinética ping-pong.

II.2.5.b.- Estereoselectividad de las lipasas

Las lipasas son enzimas enantioselectivas; propiedad que ha permitido llevar a cabo transformaciones regio- y enantioselectivas que no eran posibles por técnicas de Síntesis Orgánica tradicional y que serán analizadas en el próximo apartado (ver II.2.6.)

II.2.5.b.1.- Parámetros de enantioselectividad

Con el fin de cuantificar la enantioselectividad de una enzima en una determinada reacción, Sih y cols.^{70,72} definieron un parámetro denominado Coefficiente de enantioselectividad (E). Este coeficiente se definió como la relación entre los parámetros V_{\max} y K_M de los dos enantiómeros A_R y A_S .

Durante una reacción enantioselectiva, si los dos enantiómeros compiten por el centro activo de la enzima y se cumplen las exigencias de la teoría del estado estacionario postuladas por Michaelis-Menten, las velocidades de reacción de ambos enantiómeros se pueden definir en función de los parámetros cinéticos K_{cat} y K_M , según las siguientes ecuaciones:

$$V_{AR} = (k_{cat} / K_M)_{AR} [E] [A_R] \quad [10]$$

$$V_{AS} = (k_{cat} / K_M)_{AS} [E] [A_S] \quad [11]$$

Por tanto, el coeficiente de enantioselectividad (E), siguiendo la definición anterior se puede expresar según la ecuación 12

$$E = \frac{V_A}{V_B} = \frac{(V_{max} / K_M)_A}{(V_{max} / K_M)_B} \quad [12]$$

Dado que estas constantes cinéticas están relacionadas con la energía libre de ambos estados de transición, la enantioselectividad de una reacción está relacionada con la diferencia de energía de los estados de transición correspondientes a cada isómero (ecuación 13).

$$\Delta \Delta G^\ddagger = (\Delta G^\ddagger_A - \Delta G^\ddagger_B) = -RT \ln \frac{(k_{cat} / K_M)_A}{(k_{cat} / K_M)_B} \quad [13]$$

Actualmente, para reacciones irreversibles en lugar de utilizar todos estos parámetros, característicos de las reacciones correspondientes a cada uno de los enantiómeros, se simplifica el proceso empleando la expresión matemática propuesta por Sih y cols.^{70,72}, que relaciona el valor de E con la conversión (c) y el exceso enantiomérico del sustrato (ee_s) o del producto (ee_p). **El inconveniente de este parámetro es que solo se puede aplicar en ecuaciones de primer orden o de pseudoprimer orden**, es decir en aquellas reacciones donde solo haya un sustrato o en las que uno de ellos está en una concentración muy superior, como la reacción de hidrólisis de ésteres, en la cual uno de los reactivos (el agua) es el disolvente de la reacción y la velocidad de reacción depende únicamente de la concentración del éster.

$$E = \frac{\ln [(1-c) (1-ee_s)]}{\ln [(1-c) (1+ee_p)]} \quad [14]$$

$$E = \frac{\ln [1-c (1-ee_p)]}{\ln [1-c (1+ee_p)]} \quad [15]$$

En estas ecuaciones la conversión y los excesos enantioméricos se expresan en tanto por uno.

II.2.5.b.2.- Determinación experimental del grado de enantioselectividad de una reacción.

Para determinar el grado de enantioselectividad alcanzado en una reacción la metodología más utilizada es la cromatografía por HPLC con columna quirál.

La cromatografía se basa en la distribución de un compuesto entre dos fases: una móvil y otra estacionaria. Hasta hace pocos años, la mayoría de las fases estacionarias utilizadas en cromatografía gaseosa y en cromatografía líquida eran aquirales, lo que significaba que la separación de enantiómeros no podía realizarse directamente, sino que previamente había que formar diastereoisómeros por reacción con un agente ópticamente puro.

Brooks y Gilbert⁷⁶ desarrollaron por primera vez un método de separación de los dos isómeros de Ibuprofen por cromatografía gaseosa, mediante la formación de amidas diastereoisoméricas de este ácido con R(+) α -metil bencil amina. A partir de ese momento, han ido apareciendo en la bibliografía diversos métodos de separación de enantiómeros de ácidos 2-arilpropiónicos mediante cromatografía, previa derivatización^{77,78}.

No obstante, es más útil utilizar un método cromatográfico directo de separación de enantiómeros utilizando una fase estacionaria quirál y una fase móvil aquirál. En la presente Tesis Doctoral se ha seguido esta metodología utilizando columnas quirales tipo Chiralcel (Daicel Chemical Ind.), cuya fase estacionaria supramolecular es un derivado de celulosa y una fase móvil aquirál, con una composición determinada según el ácido 2-arilpropiónico analizado (*Tabla 13*). Dado que experimentalmente se determina el exceso enantiomérico del ácido quirál (producto de la reacción de hidrólisis de los esteres de dichos ácidos 2-arilpropiónicos), para calcular el coeficiente enantiomérico (E) de la reacción de hidrólisis se utilizará la ecuación [15].

II.2.6.- ACTIVIDAD DE LAS LIPASAS EN MEDIO ORGANICO

El medio natural de actuación de las enzimas durante los procesos biológicos es el agua. En este medio las enzimas adoptan una conformación plegada de forma que los aminoácidos apolares se colocan hacia el interior de la molécula, mientras que los residuos polares se disponen en la superficie en contacto con el agua del medio⁷⁹. En medio orgánico las enzimas tenderían a plegarse en sentido contrario, de forma que quedarán en la superficie los residuos apolares. Este hecho conduce al planteamiento de cómo es posible que las enzimas puedan retener su actividad catalítica en medio orgánico.

Las diversas investigaciones llevadas a cabo coinciden en señalar que la estructura enzimática en medio orgánico no se modifica, y por tanto, la actividad enzimática se mantiene. Algunos autores afirman que una enzima nativa en medio orgánico sufre un atrapamiento cinético, debido a las interacciones hidrófobas producidas por la baja constante dieléctrica del medio, lo que permite el mantenimiento de la estructura protéica. Esta rigidez enzimática se ha comprobado en la proteinasa α -lítica mediante técnicas de RMN de deuterio en estado sólido⁸⁰ y en la α -quimotripsina mediante técnicas de resonancia de spin electrónico⁸¹. Otros autores han comprobado que tras liofilizar una disolución enzimática, dicha enzima mantiene la conformación que tenía al pH de la disolución de partida y además dicha conformación se mantiene cuando la enzima liofilizada se utiliza en un medio con disolventes orgánicos anhidros⁸². Finalmente, se ha comprobado por medio de diagramas de difracción de rayos-X, que la estructura de la subtilisina Carlsberg cristalizada en acetonitrilo anhidro es idéntica a la de la enzima en agua⁸³.

II.2.6.a.- Ventajas de la catálisis enzimática en medio orgánico

El empleo de enzimas como catalizadores en medio orgánico presenta una serie de ventajas^{13,84}:

- 1).- aumento de la solubilidad de la mayoría de los compuestos orgánicos
- 2).- posibilidad de llevar a cabo reacciones que son imposibles en medio acuoso debido a restricciones cinéticas o termodinámicas.
- 3).- aumento de la estabilidad enzimática
- 4).- sencilla recuperación de los productos de reacción

- 5).- debido a la insolubilidad de las enzimas en medio orgánico es posible su recuperación al final de la reacción por simple filtración, lo que permite su posterior reutilización.
- 6).- eliminación de contaminaciones microbianas.
- 7).- se evitan reacciones secundarias provocadas por el agua, como la hidrólisis de los anhídridos de ácido utilizados como agentes acilantes o la polimerización de las quinonas, utilizadas como regenerador de cofactores.
- 8).- aumenta su estabilidad térmica, permitiendo su utilización a temperaturas elevadas, hasta 100 °C⁸⁵⁻⁸⁷.
- 9).- las enzimas inmovilizadas por adsorción sobre superficies no porosas no se desprenden del soporte cuando se utilizan en medio orgánico.

II.2.6.b.- Elección del disolvente orgánico

La naturaleza del disolvente orgánico afecta a la estabilidad y actividad enzimática por tres vías⁷⁰:

a).- Inhibiendo o inactivando la enzima por interacción directa con ella, ya que el disolvente orgánico puede distorsionar los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrófobas que mantienen la estructura protéica, provocando una disminución de su actividad y estabilidad⁸⁸.

b).- Los disolventes orgánicos pueden interaccionar con sustratos o con productos de la reacción. Por ejemplo, el cloroformo provoca una significativa disminución de la actividad catalítica de la peroxidasa durante la reacción de oxidación de fenoles⁸⁹.

c).- el disolvente orgánico puede interaccionar con la capa de agua esencial que rodea a las enzimas, provocando la alteración de su conformación activa. La interacción entre el disolvente orgánico y el agua esencial de una enzima es directamente proporcional al carácter polar de dicho disolvente; ya que los disolventes polares tienen mayor capacidad para captar esas moléculas de agua, provocando la desnaturalización, y por tanto desactivación enzimática⁹⁰. Esta vía de alteración enzimática es la más importante en el caso de las lipasas.

En general, la eficacia catalítica de las enzimas disminuye al aumentar la polaridad del disolvente⁷⁵. Se ha comprobado que los disolventes polares pueden desactivar las enzimas; al captar el agua esencial para el mantenimiento de la conformación enzimática activa⁸² o al penetrar hasta su núcleo hidrofóbico, alterando su delicada conformación⁹¹.

Con el fin de optimizar la actividad catalítica de las enzimas en medio orgánico se suele utilizar el parámetro logP (coeficiente de partición del disolvente en un medio bifásico *n*-octanol/agua)^{92,93}, como medida de la polaridad de los disolventes orgánicos^{70,94,95}. Laane y cols.⁹⁶ analizaron la relación existente entre la actividad enzimática de varias lipasas y otros parámetros fisico-químicos de los disolventes orgánicos, como la constante dieléctrica (ϵ), la capacidad de formar enlaces de hidrógeno (γ), el momento dipolar (μ) y la polarizabilidad (α), pero solo obtuvieron una correlación clara con el valor de logP.

En función del logP se han clasificado los disolventes orgánicos en tres grupos⁹⁶:

I).- logP < 2 (solubilidad en agua superior al 0,4 %). Distorsionan la delicada y vital capa de agua que rodea a las proteínas, ya que penetran en dicha capa o reemplazan las moléculas de agua de dicha capa⁹⁷.

II).- log P entre 2 y 4 (solubilidad en agua entre 0,04 y 0,4 %). Distorsionan las interacciones enzima-agua, pero en menor medida que los disolventes anteriores. Alteran la actividad enzimática de forma impredecible.

III).- logP > 4 (insolubles en agua). No distorsionan el escudo de moléculas de agua que rodean a la proteína y mantienen a la enzima en su estado activo.

Así pues, los disolventes apolares como: hexano, isooctano, tolueno, ciclohexano, *terc*-butil- y diisopropiléter y derivados halogenados como tricloro- o trifluoroetano han sido utilizados con éxito como disolventes en reacciones catalizadas por lipasas. Sin embargo, al utilizar disolventes polares como N,N-dimetilformamida (DMF), piridina y *n*-butanol, se altera la estabilidad enzimática y se desactiva el biocatalizador⁷⁰.

Centrándonos en el comportamiento de la lipasa de *Rh.miehei* diremos que Zaks y

Klibanov¹³, tras analizar la influencia de la naturaleza del disolvente orgánico en la actividad de tres lipasas de origen diverso (lipasa pancreática porcina, lipasa de *Rh.miehei* y lipasa de *C.cylindracea*) durante la reacción de transesterificación de tributirina y *n*-heptanol, observaron que la lipasa de *Rh.miehei* ocupa una posición intermedia respecto a su sensibilidad a la naturaleza del disolvente, ya que la actividad de la lipasa de *C.cylindracea* es directamente proporcional a la naturaleza del disolvente y la actividad de la lipasa pancreática porcina no tiene ninguna relación con el mayor o menor grado de polaridad del medio, debido probablemente a que sus moléculas esenciales de agua están más fuertemente unidas y es más difícil que el disolvente las elimine⁹⁶. Además, comprobó que ninguna de estas lipasas era activa en dimetilsulfóxido y DMF, debido a la disolución de las proteínas en estos disolventes, mientras que en los otros disolventes las lipasas se mantenían en suspensión y activas.

Miller y cols.⁹⁸ analizaron la actividad de la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* (Lipozyme® IM20) en la reacción de síntesis del miristato de propilo utilizando diferentes disolventes. Comprobaron que esta lipasa es prácticamente inactiva en disolventes polares o miscibles en agua, mientras que presenta una elevada actividad en disolventes apolares. Además, comprobaron que en algunos casos en los que se utilizaron disolventes polares era posible recuperar la actividad enzimática resuspendiendo la lipasa en un disolvente apolar como el hexano y añadiendo una cierta cantidad de agua. Esta recuperación solo fue posible en el caso del tetrahidrofurano (THF) debido a que este disolvente elimina solamente las moléculas de agua unidas muy débilmente a la enzima, provocando pocas alteraciones conformacionales, las cuales son fáciles de solventar al adicionar cierta cantidad de agua. Por el contrario, al seguir el mismo procedimiento con DMF, la enzima no recuperaba su actividad, ya que este disolvente elimina todo el agua de la molécula provocando alteraciones irreversibles de la proteína.

En conclusión, el disolvente orgánico ideal para una determinada reacción es aquel que solubiliza los sustrato⁹⁹ y no desorbe ni distorsiona el manto acuoso esencial para el mantenimiento de la conformación activa de la enzima¹⁰⁰.

II.2.6.c.- Importancia del agua en la actividad enzimática en medio orgánico.

Como se indicó anteriormente, el medio biológico de actuación de las enzimas es el agua, ya que participa directa o indirectamente en todas las interacciones no covalentes (interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals¹⁰¹ que permiten el mantenimiento de la conformación nativa, y por tanto, catalíticamente activa de las enzimas^{102,103}. Además, se ha comprobado que aunque las enzimas mantienen perfectamente su actividad y conformación en medio orgánico, se pueden inactivar si se elimina todo el agua del medio, ya que el disolvente orgánico captará moléculas de agua de la enzima. Por tanto, la cuestión que hay que plantearse no es si las enzimas necesitan agua, sino cuanta agua necesitan para mantener su conformación activa en un medio determinado¹³.

El método más correcto para establecer la cantidad de agua esencial para la actividad de una determinada enzima se basa en la correlación entre la actividad catalítica y la cantidad de agua *disponible* por la enzima en un disolvente orgánico. Esta correlación se obtiene a través del concepto de actividad de agua (a_w), que es el mejor parámetro para describir la distribución de agua en sistemas multifásicos¹⁰⁴.

II.2.6.c.1.- Actividad de agua (a_w)

Si suponemos un sistema cerrado en el que una fase gaseosa húmeda se encuentra en equilibrio con una fase líquida, también húmeda, se puede definir la actividad de agua (a_w) de la fase líquida a una temperatura dada como [16]¹⁰⁵ :

$$a_w = \frac{f_w}{f_w^0} \quad [16]$$

donde: f_w es la fugacidad del agua en la mezcla a la temperatura de equilibrio
 f_w^0 es la fugacidad del agua pura a la misma temperatura.

Si la concentración de agua en el sistema es pequeña (como sucede en los procesos biocatalizados en medios orgánicos ligeramente hidratados) y se trabaja a bajas presiones (p.e. a presión ambiental de 1 atm), se puede suponer que el vapor de agua se comporta como un

gas ideal, por lo que se puede sustituir la fugacidad por la presión parcial del vapor de agua [17].

$$a_w = \frac{P_w}{P_w^0} \quad [17]$$

La presión de vapor del agua pura (P_w^0) en estas condiciones se considera igual a la unidad. La ecuación transformada y expresada en tanto por ciento se define como *Humedad relativa en el equilibrio* (HRE) [18].

$$\text{HRE} = P_w \cdot 100 = a_w \cdot 100 \quad [18]$$

II.2.6.c.2.- Isotermas de adsorción

En la práctica, la actividad de agua (a_w) se determina introduciendo la muestra en una cámara de medida cerrada, a temperatura constante y con volumen lo más pequeño posible. Pasado un tiempo, se alcanza el equilibrio entre la humedad del aire de la cámara y la de la muestra. Esta humedad relativa del aire en la cámara de medida, corresponde a P_w , y si consideramos $P_w^0 = 1$, obtenemos el valor de a_w a partir de [17].

La forma más común de representar estos datos, es una curva que mide la variación de la cantidad de agua añadida (g. agua / g. muestra) frente a a_w . Según las medidas sean efectuadas durante la deshidratación de la muestra (*desorción*) o en el curso de la rehidratación de la misma (*adsorción o resorción*) se obtendrán dos curvas, que no tienen por qué coincidir (fenómeno de histéresis).

Como se indica en la Figura 8 una isoterma de adsorción se divide tres zonas.

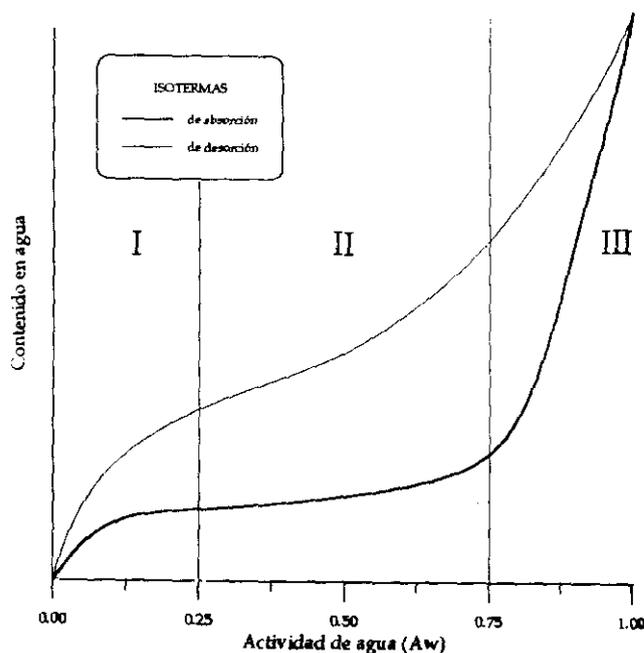


Figura 8: Isoterma teórica de adsorción-desorción.

Al analizar el contenido en agua de una enzima hay que considerar dos fracciones de moléculas unidas a las enzimas¹⁰⁶:

a).- la primera fracción está constituida por moléculas de agua fácilmente separables, que pueden ser fácil y exactamente cuantificadas por desorción. Estas moléculas de agua residual (no superior a 0,07 mg agua/mg de enzima), se cree que interaccionan solamente con grupos funcionales cargados y algún agrupamiento de aminoácidos polares¹⁰⁷. El agua que se desorbe inicialmente procede tanto de residuos polares, como no polares de la secuencia polipeptídica de la enzima; aunque, evidentemente, los residuos más expuestos al medio serán los más polares. La energía libre de desorción, de estas moléculas de agua hacia el disolvente orgánico es favorable ($\Delta G < 0$).

b).- la segunda fracción de moléculas de agua se mantienen fuertemente unidas a la enzima y constituyen parte de su estructura. Su desorción desde zonas cargadas de la enzima hacia el disolvente orgánico suele ser termodinámicamente desfavorable ($\Delta G > 0$).

En la isoterma teórica (Figura 8) se pueden diferenciar tres zonas, que se corresponden con los diversos tipos de moléculas de agua unidas a la enzima:

Zona I: El agua presente en esta zona de la isoterma es el agua más fuertemente unida, que en el caso de las proteínas correspondería al agua de cristalización. Este agua está unida a zonas polares de la proteína por interacciones agua-ión o agua-dipolo. La entalpía de vaporización de este agua es mucho mayor que la del agua pura, y no puede congelarse a -40 °C. El límite de las zonas I y II corresponde al contenido de humedad "monocapa". Al contrario de lo que pueda inferirse del nombre, la monocapa no significa la cobertura de toda la materia seca por una capa simple de moléculas de agua densamente empaquetadas, sino que se trata de la cantidad de agua necesaria para formar una monocapa sobre los grupos altamente polares y accesibles de la materia seca.

Zona II: El agua añadida en la zona II ocupa los restantes sitios de la primera capa y varias capas adicionales (agua en multicapa). La entalpía de vaporización del agua en multicapa es ligera o moderadamente superior a la del agua pura.

Zona III: El agua de la zona III es el agua menos ligada a la proteína y por ello se denomina "agua de la fase masiva". Tiene una entalpía de vaporización igual que la del agua pura, por lo que se trata de agua congelable.

II.2.6.c.3.- Competencia por el agua en un sistema biocatalítico

La disponibilidad del agua alrededor de las moléculas activas de enzima depende de la presencia de elementos en el sistema que pueden competir por el agua, según sea su afinidad por la misma, como: los disolventes orgánicos, los reactivos, los aditivos y los soportes.

Disolventes orgánicos

Como se indicó anteriormente (*ver II.2.6.b.*) los disolventes compiten, en función de su polaridad, con la enzima por el agua.

La capacidad de captación de agua por parte del disolvente se refleja en su isoterma de adsorción. Halling y cols.¹⁰⁸ comprobaron la similitud existente entre las isotermas de

adsorción de agua de las proteínas en aire y en disolventes de diferente polaridad hasta un valor de a_w próximo a 0,5. De esta forma dedujo que el disolvente no influye en la cantidad de agua fuertemente ligada a la enzima (que corresponde al agua que todavía queda retenida tras la liofilización).

Al realizar estudios de actividad con lipasas en disolventes tan dispares como hexano ($\log P = 3,5$) y 3-pentanona ($\log P = 0,8$), se observó que, en todos los casos e independientemente de la polaridad del medio, la actividad enzimática óptima de las lipasas analizadas se situaba en torno a una $a_w = 0,55$ ¹⁰⁹. Por tanto, la medida de la actividad de agua permite establecer las condiciones idóneas de reacción.

Reactivos

La naturaleza y concentración de los sustratos sobre los que actúan las enzimas pueden alterar la distribución del agua en el sistema. Así por ejemplo, una concentración elevada de alcohol¹¹⁰ o de ácido¹¹¹ en una reacción de esterificación catalizada por lipasas, puede provocar una disminución drástica de la actividad enzimática debido a un aumento de la capacidad de la fase orgánica para solubilizar agua, y por tanto de sustraerla del biocatalizador.

Aditivos

Las sales pueden competir con las moléculas de enzima por captar el agua del medio¹¹². De la misma forma, los azúcares presentes en muchos preparados enzimáticos comerciales, son capaces de captar agua¹¹³.

Compuestos similares al agua como el glicerol y otros glicoles¹¹⁴, la N,N-dimetilformamida¹¹⁵ y el dimetilsulfóxido¹¹⁶ son capaces de alterar la actividad enzimática, ya que estos compuestos actúan como miméticos del agua y en algunos casos la adición de estos compuestos produce un incremento en la actividad de muchos biocatalizadores.

Soportes

Reslow y cols.¹¹⁷ demostraron que la naturaleza del soporte sobre el que se inmoviliza una enzima influye en la actividad catalítica de la enzima inmovilizada. Este comportamiento es debido a la "acuofilia" del soporte, que es la capacidad de éste para adsorber agua,

utilizando como disolvente de referencia el diisopropiléter saturado en agua. Estudios análogos^{111,118} demostraron que los soportes hidrófobos favorecen la actividad catalítica frente a los soportes hidrofílicos. De todas formas, ni la capacidad del soporte para absorber agua, ni su contenido en agua pueden pronosticar una determinada actividad en una reacción biocatalizada.

En el equilibrio, la a_w será la misma en todas las fases del sistema, incluyendo el soporte donde la enzima se encuentra inmovilizada. Controlando el valor de a_w del sistema, se ha podido comprobar que el perfil de la curva actividad enzimática/ a_w es similar en la mayoría de los soportes utilizados¹¹⁹⁻¹²²

II.2.7.- APLICACIONES DE LAS LIPASAS

II.2.7.a.- Evolución histórica de la aplicación industrial de las enzimas

El uso de enzimas en procesos industriales se remonta a las antiguas civilizaciones orientales de China y Japón, que utilizaban las enzimas para la producción de alimentos y bebidas alcohólicas. Homero describe, en una de sus obras, el proceso seguido por los griegos para la elaboración de queso; removiendo la leche con una rama de higuera. Esta rama liberaba una proteasa que provocaba la coagulación de la leche.

En 1875 Christian Hansen desarrolló la primera industria de producción de enzimas. En su fábrica producía una preparación enzimática estandarizada, compuesta por una mezcla de quimosina, también denominada renina, y pepsina. Esta preparación se denominó cuajo y se utilizó en la preparación de quesos.

Pero, hasta 1955, con la producción de la glucoamilasa, no se desarrolló a gran escala la industria de las enzimas. Sin embargo, fue la utilización de las proteasas en la composición de los detergentes el factor que impulsó definitivamente esta industria. A partir, de ese momento se iniciaron diversos frentes de investigación acerca de las enzimas y su utilización. Las aplicaciones del uso de enzimas se dividen en cuatro categorías¹²³:

1).- enzimas como productos finales:

- industria de detergentes
- industria de agentes de limpieza
- industria farmacéutica
- industria de alimentación animal

2).- enzimas como elementos del proceso

industria textil
industria del cuero
industria papelera
industria azucarera
industria cafetera

3).- producción de alimentos y bebidas

industria quesera
industria cervecera
industria del vino y de los zumos
industria de productora de proteínas
industria cárnica
industria panadera
industria de grasas y aceites

4).- enzimas como catalizadores industriales

procesamiento del almidón
producción de antibióticos
industria dedicada a la química fina.

II.2.7.b.- Aplicaciones industriales de las lipasas

Aunque la "industria" de las lipasas se ha desarrollado más lentamente que la de otro tipo de enzimas industriales como las proteasas y carbohidrasas, recientemente se han propuesto nuevas aplicaciones potenciales para este tipo de enzimas, lo que las hará enormemente competitivas con las anteriormente mencionadas.

El interés actual acerca del uso de las lipasas en procesos biotecnológicos se debe, fundamentalmente, a que estas enzimas¹²⁴:

a).- son capaces de catalizar reacciones de síntesis o de hidrólisis de ésteres controlando las condiciones de reacción; ya que, las lipasas pueden trabajar en medios muy variados, desde soluciones acuosas a medios orgánicos, sin que sufran una desactivación apreciable

b).- son enzimas asequibles dada su alta producción mediante técnicas de ingeniería genética

c).- no son excesivamente sensibles a la estructura del sustrato, lo que las convierte en biocatalizadores de amplio espectro.

La oferta comercial de lipasas microbianas por parte de laboratorios japoneses, europeos y americanos, se ha incrementado espectacularmente, debido a su gran variedad de aplicaciones y a su bajo precio. En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos de lipasas comerciales.

Tabla 2: Lipasas microbianas comerciales más utilizadas.

Lipasa de ...	nombre comercial	laboratorio suministrador
<i>Aspergillus niger</i>	Amano A	Amano
<i>Candida rugosa</i>	LipaseOF, Amano Lipase AY	Sigma y Amano
<i>Rhizomucor miehei</i>	Amano R-10, Lipozyme	Amano y Novo-Nordisk
<i>Candida antártica</i>	SP525, SP435A,Novozym435	Novo-Nordisk y Fluka
<i>Geotrichum candidum</i>	Amano lipase GC	Sigma y Amano
<i>Humicola lanuginosa</i>	Lipolase	Novo-Nordisk
<i>Pseudomonas cepacia</i>	AmanoP; PS, PS30, LP80	Amano y Fluka

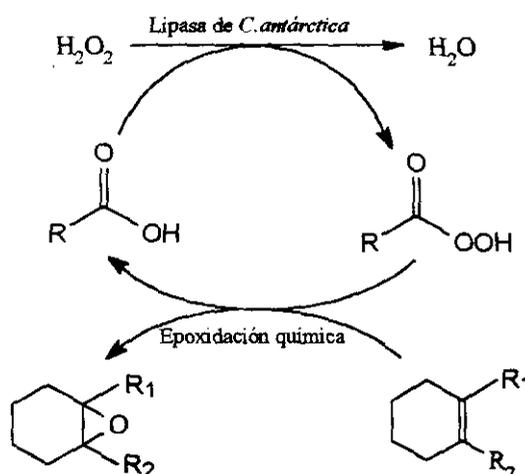
Las lipasas se utilizan fundamentalmente en la industria alimentaria (producción de quesos y elaboración de leche para lactantes) y en la industria de grasas y aceites. Asimismo, se emplean en la industria de los detergentes, de los agentes de limpieza, en la industria farmacéutica, en la industria papelera y como catalizadores en numerosas reacciones de síntesis orgánica.

II.2.7.c.- Utilización de las lipasas en reacciones de síntesis orgánica

En la presente Tesis Doctoral el estudio de las aplicaciones de las lipasas se ha centrado en su utilización como catalizadores de reacciones de Síntesis Orgánica, ya que las lipasas pueden catalizar reacciones difíciles de llevar a cabo por métodos químicos convencionales. A continuación se indican algunos ejemplos.

** Oxidación indirecta de ácidos*

El descubrimiento reciente de que las lipasas pueden catalizar la formación de peroxiácidos carboxílicos a partir del correspondiente ácido carboxílico y peróxido de hidrógeno, sería otro ejemplo de aplicación de lipasas en procesos químicos orgánicos¹²⁴. El proceso objeto de estudio se representa a continuación:

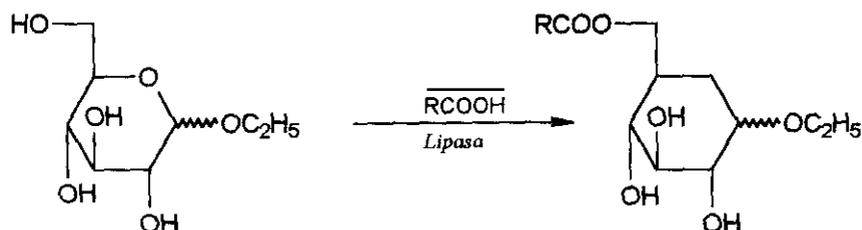


Esquema 4: Oxidación indirecta de un ácido, catalizada por lipasas.

La lipasa cataliza la oxidación del ácido en perácido, presumiblemente por el intercambio del grupo $-\text{OH}$ por $-\text{OOH}$. Esta reacción se ha utilizado en la epoxidación de ciclohexeno por tratamiento del alqueno con lipasa, H_2O_2 , y un ácido carboxílico de cadena larga o media.

*** Esterificación regioselectiva de O-glucósidos.**

La lipasa B de *Candida antarctica* se ha empleado en la esterificación regioselectiva en C₆ de glucósidos¹²⁵. El coste de este proceso es bastante bajo, ya que la glucosa se obtiene fácilmente de los vegetales. Además, la no utilización de reactivos químicos tóxicos hace que este proceso tenga un gran interés industrial (Esquema 5).



Esquema 5: Esterificación regioselectiva del C₆ de O-glucósidos.

Estos compuestos, debido a sus buenas propiedades surfactantes, representan una importante alternativa a los productos ya existentes, empleados con muy diversos fines; desde cosméticos a detergentes de lavado en frío, desengrasantes industriales de metales para usos electrónicos, etc.

II.2.7.c.1.- RESOLUCION DE RACEMATOS

La actividad biológica, la biodisponibilidad y el metabolismo de un compuesto quiral puede variar de forma muy significativa de un enantiómero a otro^{126,127}. Existen numerosos ejemplos acerca del distinto comportamiento de los enantiómeros de un determinado compuesto; ya que uno puede ser activo y el otro inactivo; uno tóxico y el otro inerte, uno agonista y el otro antagonista¹²⁸. A pesar de esto la mayoría de los fármacos con centros quirales se han comercializado, hasta ahora, como mezclas racémicas debido a que la separación de los enantiómeros por métodos de síntesis orgánica convencional en algunos casos es difícil de realizar; lo que conlleva el encarecimiento y prolongación del proceso¹²⁹

En 1982, los fármacos racémicos y aquellos compuestos con un solo enantiómero puro se comercializaban en una proporción de 7 a 1. Actualmente la situación es muy diferente, tras las indicaciones propuestas por la FDA (Administración Americana de Alimentos y Medicamentos) en 1992, según las cuales los fármacos quirales dejan de ser considerados

como entidades individuales y comienzan a ser considerados como combinaciones de fármacos¹³⁰. Como consecuencia de estas directrices, el desarrollo de un fármaco quiral, si se quiere comercializar como mezcla racémica conlleva la realización de estudios farmacológicos y toxicológicos de dicha mezcla y de cada uno de los enantiómeros, lo que provoca el encarecimiento y prolongación del desarrollo de dicho fármaco.

Las circunstancias anteriormente descritas han forzado a muchas empresas farmacéuticas a sintetizar isómeros puros, o por el contrario, a dedicarse a la fabricación de moléculas aquirales. De ahí el pronóstico de que, para el año 2000, el 80% de este tipo de fármacos sintéticos sean comercializados como enantiómeros puros¹³¹ (Figura 9).

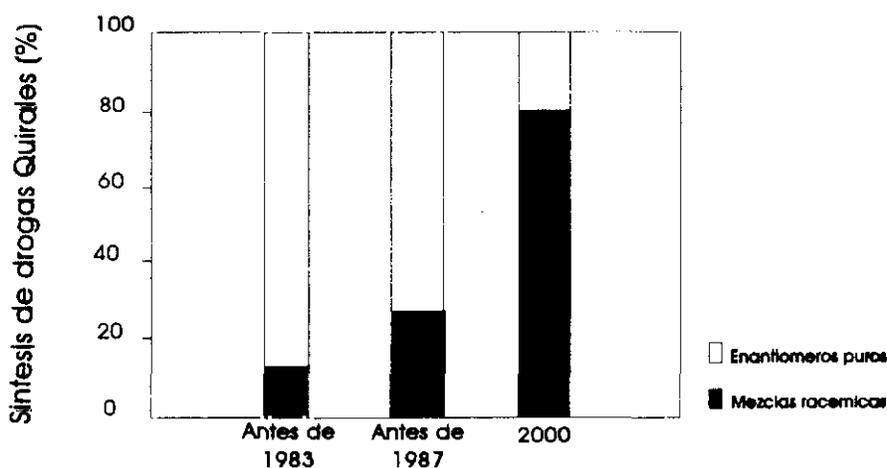


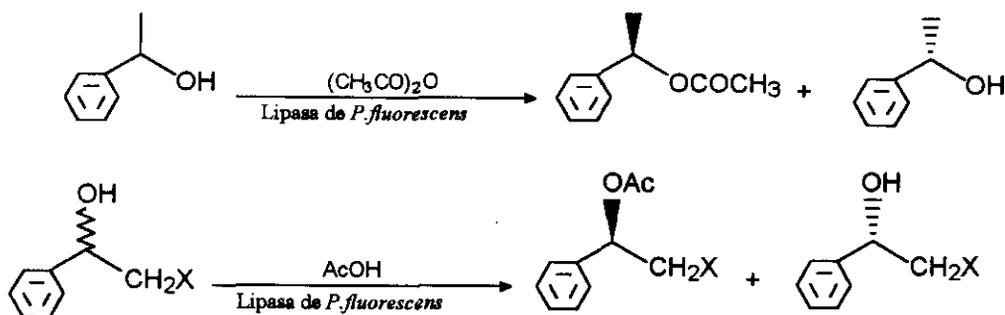
Figura 9: Evolución de la producción de sustancias ópticamente puras durante los últimos años¹³².

De entre todas las posibilidades de introducir asimetría, o de resolución de racematos, los procesos biocatalizados están adquiriendo mayor importancia cada día y sin duda las lipasas presentan una enorme aplicabilidad, debido a su enantioselectividad y amplia especificidad de sustrato, lo que las convierte en instrumentos de gran valor para la obtención de compuestos enantioméricamente puros.

Realizar un estudio exhaustivo del gran número de biotransformaciones recogidas en la bibliografía sería muy extenso, por ello remitimos a una serie de referencias bibliográfica, que recogen este amplio campo¹³³⁻¹³⁸. No obstante, a continuación se indican algunos ejemplos de interés.

* Reacciones de acilación

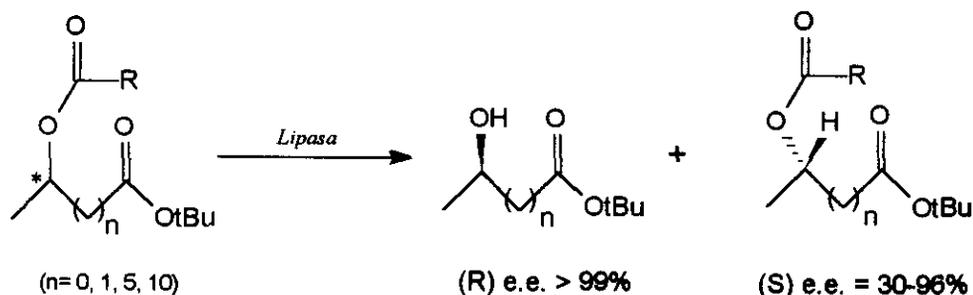
Diversos agentes acilantes se han empleado en acilaciones irreversibles y altamente enantioselectivas (e.e. > 93 %) de 2-halo-1-aryl-etanoles empleando la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*¹³⁹. Se ha demostrado que mediante el uso de esta enzima, en disolventes anhidros y de acetatos de vinilo como donadores de acilo es posible sintetizar alcoholes enantioméricamente puros¹⁴⁰⁻¹⁴² de gran interés sintético (Esquema 6).



Esquema 6: Síntesis de alcoholes enantioméricamente puros.

* Reacciones de hidrólisis

Scilimati y cols.¹⁴³ llevaron cabo la resolución de ésteres racémicos catalizada por lipasas; para lo cual seleccionó un éster no hidrolizable en carboxilo terminal para mejorar la enantioespecificidad en la hidrólisis del otro grupo éster (Esquema 7).



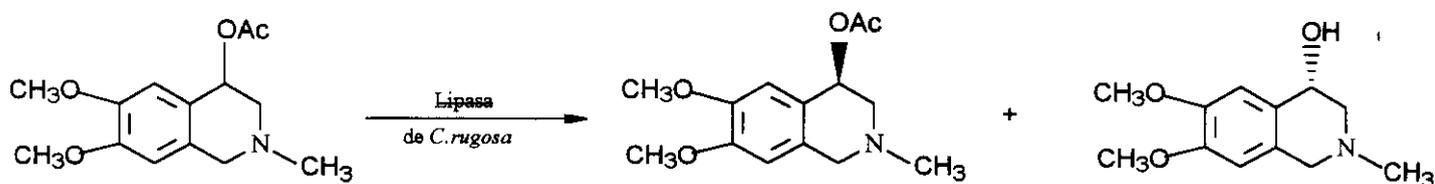
Esquema 7: Hidrólisis enantioselectiva de ésteres.

El análisis de las influencias estructurales en la hidrólisis de ésteres es uno de los puntos de mayor actualidad en el campo de la biocatálisis. Tras el estudio de la influencia del tamaño del anillo en la hidrólisis de acetatos cíclicos, catalizada por la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, se ha observado que los acetatos con configuración R se hidrolizan preferentemente, con alta enantioselectividad, independientemente del tamaño del anillo¹⁴⁴⁻¹⁴⁶.

Las lipasas de páncreas porcino y la de *Candida rugosa* realizan la hidrólisis enantioselectiva de ésteres bicíclicos¹⁴⁷ con un exceso enantiomérico superior al 94 % para el caso concreto de los acetatos y de los butiratos de endo-7-oxabicyclo [2,2,1] hept-2-ilo, para así obtener los correspondientes alcoholes bicíclicos y ésteres ópticamente puros con un e.e.= 93-97 %¹⁴⁸.

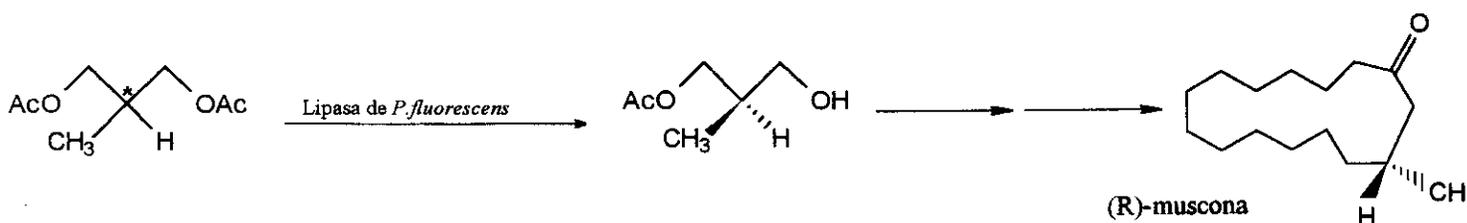
Varias lipasas, de *Pseudomonas fluorescens*, *Aspergillus niger* y *Candida rugosa*, se han probado en la hidrólisis de los ésteres etílicos de 2-cloro-N-benciloxicarbonil derivados de algunos aminoácidos no naturales. Los mejores resultados se han obtenido mediante la reacción llevada a cabo con la lipasa de *Aspergillus niger*, donde se ha observado una preferencia en la hidrólisis de los enantiómeros L (e.e.= 85-96 %)¹⁴⁹. Este fue el primer intento de resolver aminoácidos no naturales, algunos de los cuales no se pueden hidrolizar mediante acilasas.

Con la lipasa de *Candida rugosa* se han obtenido los enantiómeros del trans-2-aminociclohexanol mediante hidrólisis de (+)-2-azidociclohexanoatos y posterior hidrogenación¹⁵⁰. Con esta misma enzima inmovilizada sobre celite¹⁵¹ se han resuelto acetatos de tetrahidroisoquinolinio utilizando como medio de reacción isooctano saturado con agua.



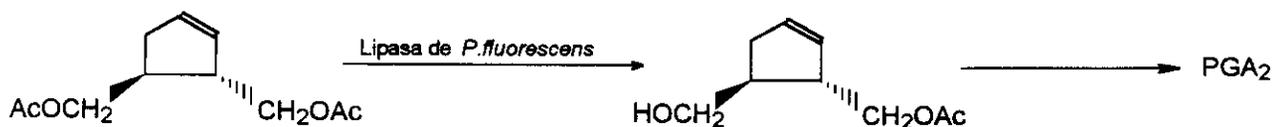
Esquema 8: Resolución de acetatos de tetrahidroisoquinolinio.

La hidrólisis enantioselectiva de diésteres, particularmente en compuestos proquirales está ahora utilizándose como método para preparar sintones quirales para la síntesis de compuestos biológicamente activos. Una fácil síntesis de R(-) muscona se ha realizado utilizando una aproximación quimioenzimática vía hidrólisis del diacetato proquiral al sintón quiral, empleando como catalizador la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*¹⁵² (Esquema 9).



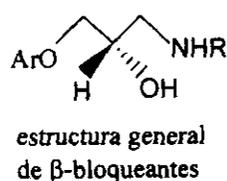
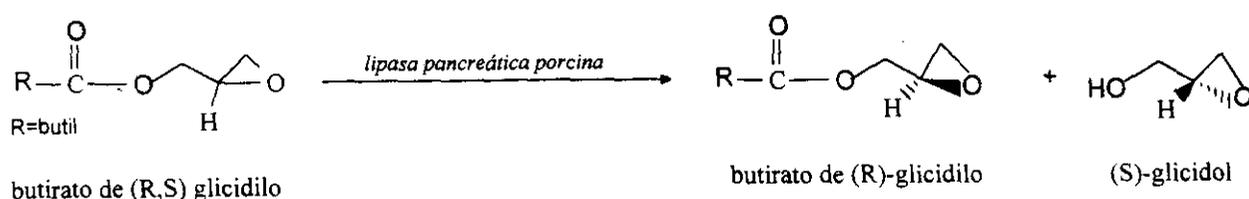
Esquema 9: Síntesis de R(-)-muscona.

Esta enzima, también se ha utilizado en la síntesis de la prostaglandina A₂ (PGA₂) vía hidrólisis regioselectiva del diacetato inicial^{153,154} (Esquema 10).



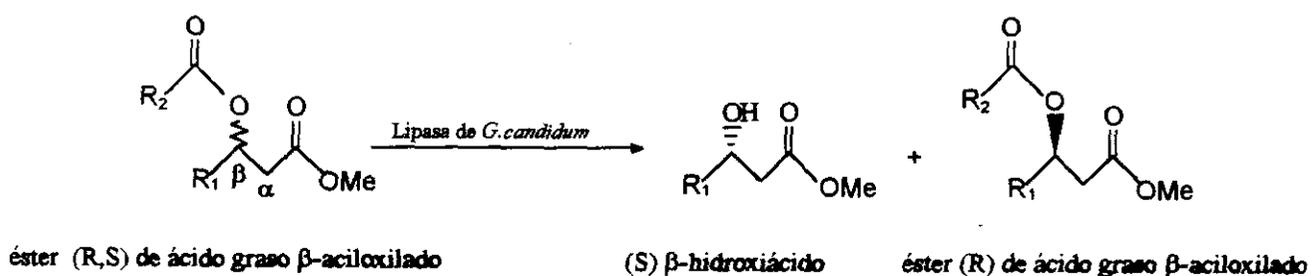
Esquema 10: Síntesis de prostaglandina A₂

La preparación de butirato de (R)-glicidilo y (R)-glicidol, elementos sillares de la síntesis de fármacos β-bloqueantes, es un importante ejemplo de la aplicación industrial de lipasas para la obtención de productos enantioméricamente puros. La lipasa pancreática porcina se empleó en la hidrólisis del éster correspondiente¹⁵⁵ (Esquema 11).



Esquema 11: Resolución enantioespecífica del butirato de (R,S)-glicidilo.

La lipasa de *Geotrichum candidum* ha sido utilizada para catalizar la hidrólisis enantioselectiva y regioespecífica de ésteres de ácidos grasos con un resto aciloxi en posición β . Los correspondientes β -hidroxiácidos liberados son componentes estructurales de muchas toxinas naturales de plantas, microorganismos y animales superiores¹⁵⁶ (Esquema 12).



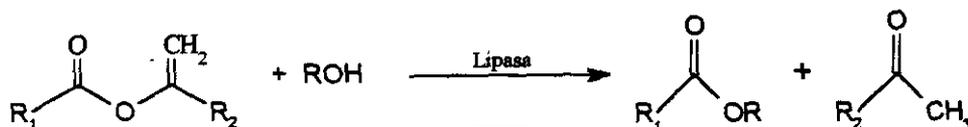
Esquema 12: Hidrólisis de ésteres de ácidos grasos β -aciloxilados.

* Reacciones de transesterificación

La transesterificación de un éster en medio acuoso catalizada por lipasas no tiene un interés práctico, porque se va a producir preferentemente la hidrólisis enzimática del sustrato y del producto. Sin embargo, cuando el agua se reemplaza por un disolvente orgánico, como medio de reacción, la situación cambia completamente, obteniéndose buenos resultados¹⁵⁷.

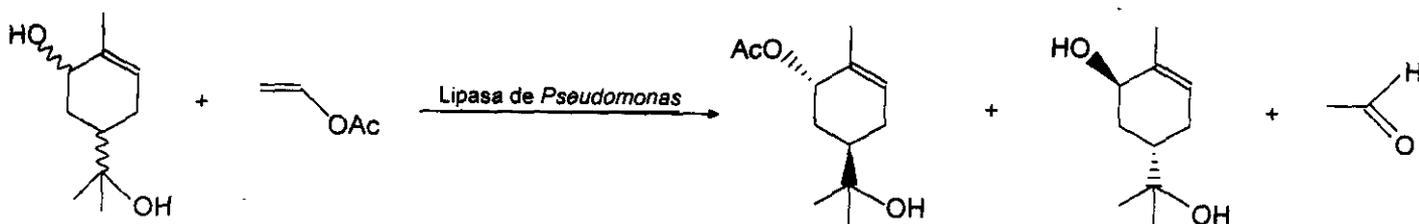
La piridina seca es el mejor disolvente para llevar a cabo la transesterificación de ésteres de ácidos carboxílicos y glúcidos empleando la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*. Esta reacción tiene interés para la producción de biosuperficies^{158,159}.

Sin embargo, la lipasa de páncreas porcino es más activa en tetrahydrofurano, habiéndose utilizado en acetilaciones regioselectivas de los hidroxilos primarios en furanósidos. El grupo donador de acilo más activo es el acetato de 2,2,2-trifluoroetilo¹⁶⁰. El grupo de Wong ha utilizado ésteres de enol, como acetatos de isopropenilo o de vinilo, como agentes de transferencia irreversible de acilo¹⁶¹. Este proceso es interesante pues el grupo saliente se tautomeriza al compuesto carbonílico correspondiente, lo que hace que la reacción sea irreversible (Esquema 13).



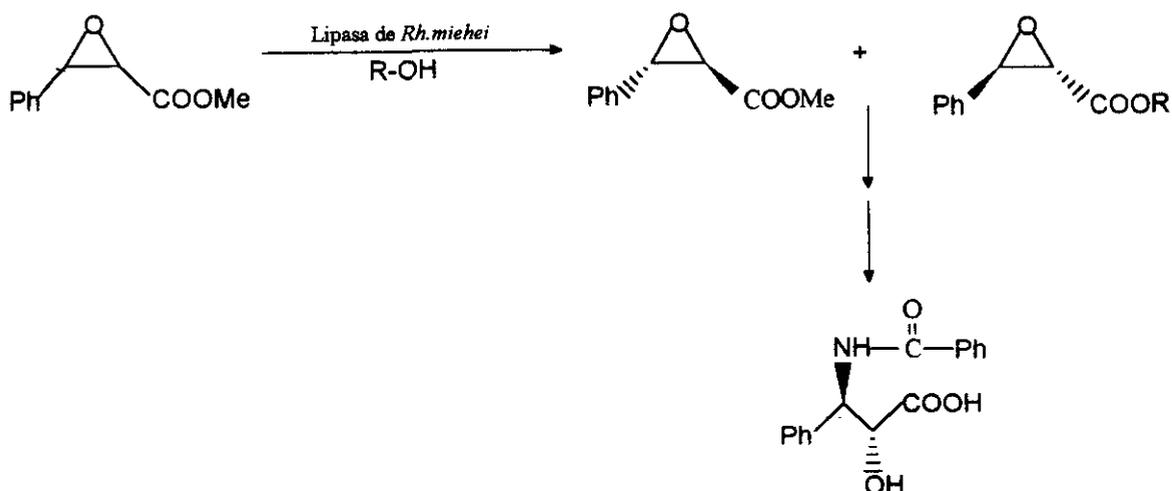
Esquema 13: Reacción de transferencia irreversible de acilo

Bovara¹⁶² llevó a cabo la resolución enantioselectiva del fármaco mucolítico (\pm) *trans*-sobrerol, por medio de una reacción de transesterificación enantioselectiva.



Esquema 14: Transesterificación del (\pm)-*trans*-sobrerol con acetato de vinilo.

La lipasa de *Rh. miehei* se empleó para la resolución del *trans*- β -fenilglucido de metilo via transesterificación¹⁶³. El exceso enantiomérico (ee) de la reacción fue del 95 %. Ambos productos, el sustrato no modificado (2R, 3S) y el producto obtenido (2S, 3R), se convirtieron en N-benzoil-(2R,3S)-3-fenil-isoserina que es la cadena lateral en C-13 del agente antitumoral Taxol (Esquema 15).



Esquema 15: Transesterificación del trans- β -fenilglicidato de metilo.

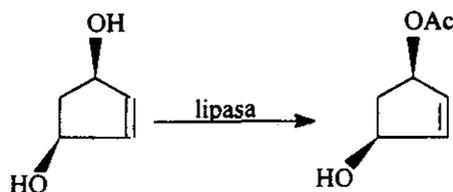
Los 2-ciclohexen-1-oles sustituidos en 2 y 3 son intermedios en la síntesis de alcaloides tales como la (+)-vincamina. La resolución cinética de dichos compuestos ha sido llevada a cabo mediante transesterificación con acetato de vinilo catalizada por la lipasa de *Rh.miehei*. El exceso enantiomérico del correspondiente éster fue del 97% ¹⁶⁴.

* Reacciones de esterificación

Las reacciones de esterificación en medio orgánico catalizadas por lipasas son más enantioselectivas que las correspondientes reacciones de hidrólisis en agua. Por esta razón las reacciones biocatalíticas desarrolladas en medio orgánico van adquiriendo una gran importancia como método de obtención de compuestos homoquirales.

Theil y cols. ^{165,166} describen la esterificación regioselectiva y enantioselectiva de un meso-diol para obtener el acetato de (1'R, 4'S)-4'-hidroxi-2-ciclopentenilo (esquema 16) que es un paso clave del proceso de síntesis de la prostaglandina E₂. El rendimiento de esta reacción fue de 50-65 % y el exceso enantiomérico (ee) superior al 99 %. La enzima empleada fue la pancreatina y el agente acilante fue el acetato de tricloroetilo.

Por su parte Johnson y Bis¹⁶⁷ obtuvieron rendimientos y excesos enantioméricos similares empleando la lipasa B de *C.antártica* y el acetato de iso-propenilo como agente acilante.



Esquema 16: Esterificación regio- y enantioselectiva de un meso-diol.

II.3.- LIPASA DE *Rhizomucor miehei*

II.3.1.- *Rhizomucor miehei*

Rhizomucor miehei es un hongo ficomiceto que en un principio se incluyó en el género *Mucor*¹⁶⁸. Tras un estudio más exhaustivo de su estructura y propiedades se observaron algunas diferencias importantes en cuanto a su morfología y requerimientos térmicos, por lo que se reclasificó dentro del género *Rhizomucor*, que fue definido como taxón por Lucet y Constantin en 1899¹⁶⁹.

Los hongos pertenecientes al género *Rhizomucor* son termófilos. Lindt (1886), Miehe (1907) y Lucet y Constantin (1900) a principios de siglo, determinaron que la temperatura óptima para el desarrollo de las cepas de estos hongos es 37-40 °C y su temperatura de crecimiento se sitúa desde 22-24 °C hasta 50 °C, muy diferentes de las temperaturas óptimas para el desarrollo de los hongos del género *Mucor*¹⁶⁹.

Morfologicamente, el género *Rhizomucor* difiere del género *Mucor* por la presencia de estolones y rizoides¹⁷⁰.

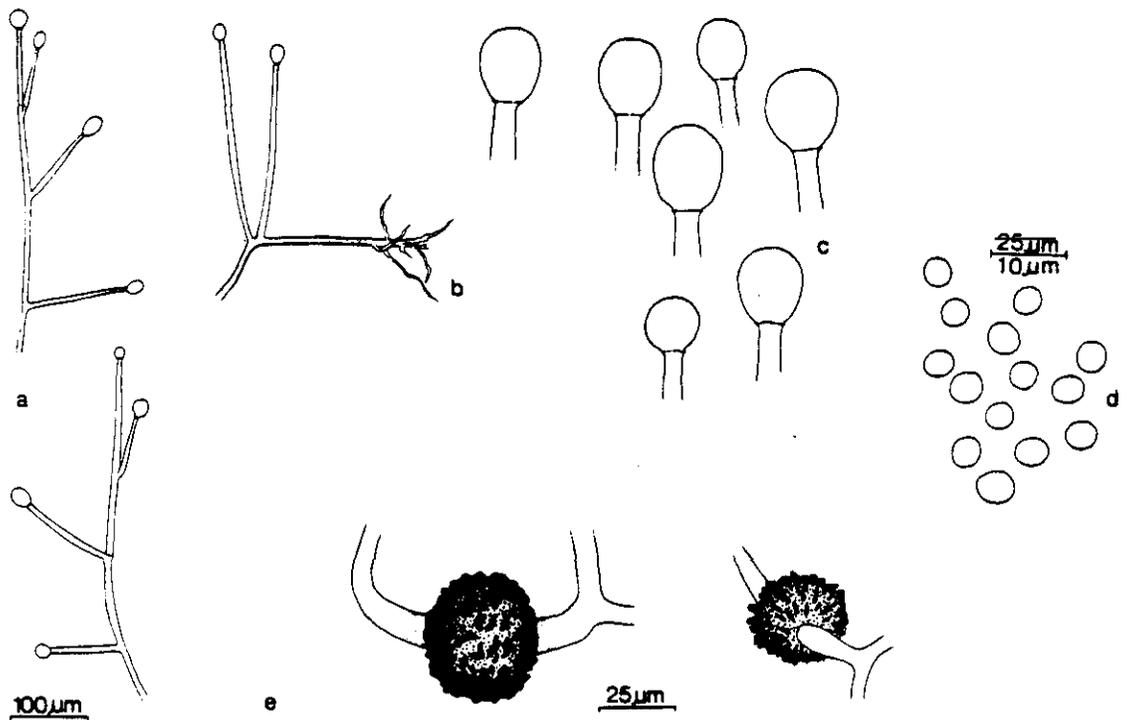


Figura 10: Esquema de la morfología del hongo *Rhizomucor miehei*. (a) esporangióforos; (b) rizoides; (c) columelas; (d) esporas; (e) zigosporas entre suspensores.

En la Figura 11 se recoge una imagen de microscopio del esporangio globoso de *Rh. miehei*, que presenta una columela piriforme y sin apófisis.

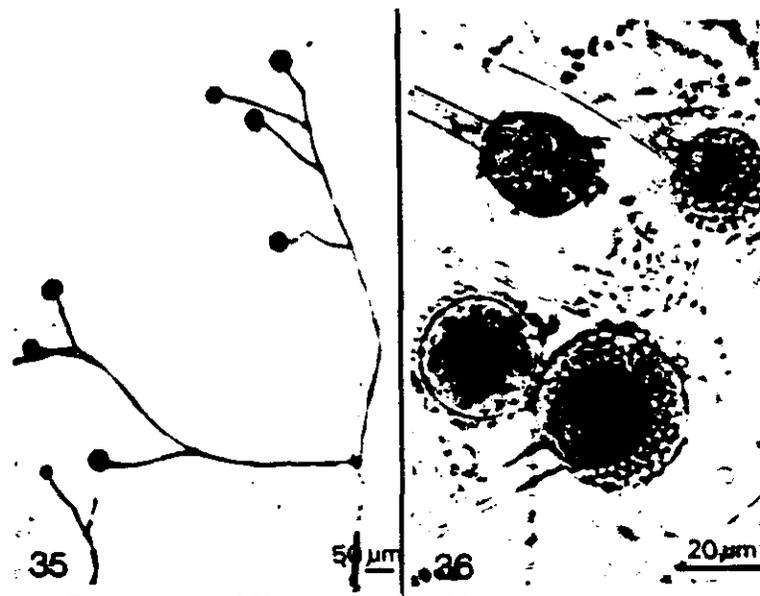


Figura 11: Imagen de microscopio del esporangio globoso de *Rh. miehei*¹⁶⁹

II.3.2.- OBTENCION DE LA LIPASA DE *Rhizomucor miehei*

El hongo ficomiceto *Rhizomucor miehei* produce una lipasa extracelular (triacilglicerol acilhidrolasa EC 3.1.1.3.) activa en la hidrólisis de un amplio espectro de lípidos de aceites y grasas de origen vegetal y/o animal¹⁷¹.

II.3.2.a.- Isoenzimas de la lipasa de *Rhizomucor miehei*

En un principio, la lipasa de *Rh.miehei* se obtuvo por fermentación de cepas selectas de dicho hongo¹⁷².

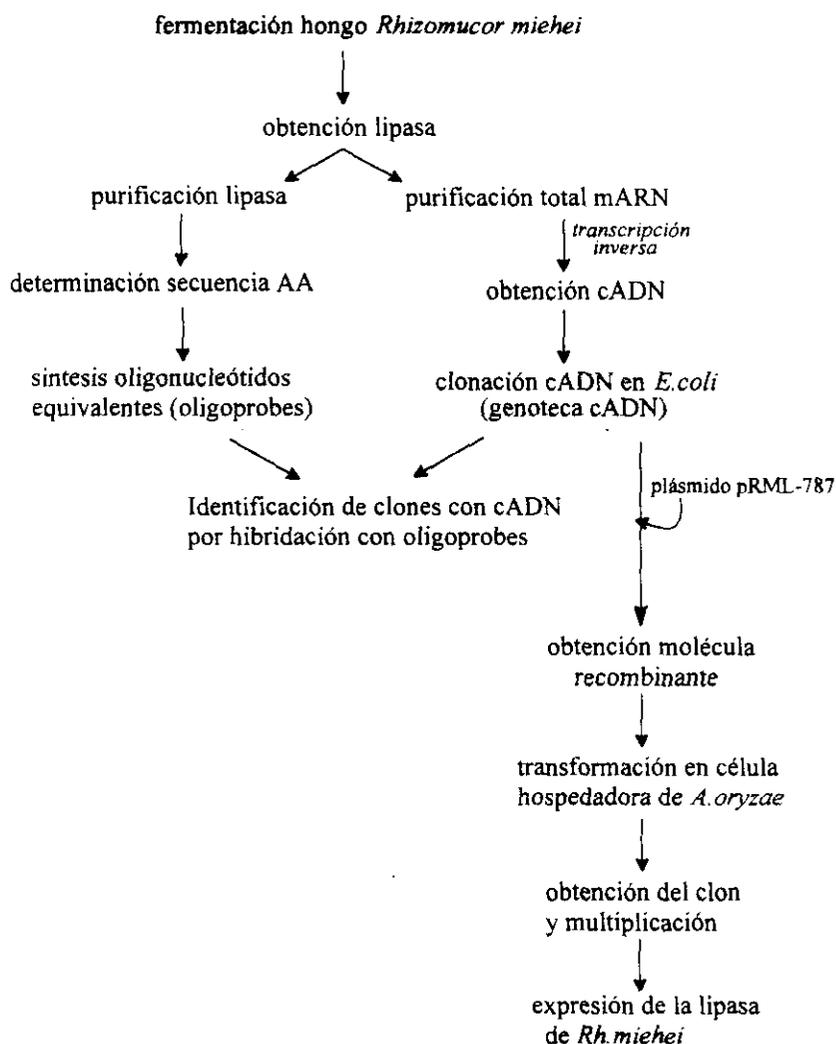
Tras diversos estudios de purificación^{173,174} se observó la existencia de dos isoenzimas A y B. Aunque en el sobrenadante de la fermentación se identificaron ambas isoenzimas, tras el proceso posterior de purificación a pH bajo se produce la deglicosilación de la forma A, que se transforma en la forma B. Las diferencias detectadas entre ambas formas enzimáticas son las siguientes¹⁷³:

- * sus cargas netas son ligeramente diferentes a pH 8
- * presentan distinto punto isoeléctrico: pI (A)= 3,9 y pI (B)= 4,3
- * la forma B es más activa, aunque es menos estable.

Las dos isoenzimas presentan también una serie de similitudes, ya que a pH 7 alcanzan ambas su máxima actividad lipásica y son específicas de la posición 1 de los triglicéridos, siendo su velocidad de reacción mayor con monoglicéridos de ácidos de cadena larga (12:0, 14:0, 16:0, 18:0) que con monoglicéridos con ácidos cortos (4:0, 6:0, 8:0)¹⁷³.

C.2.2.- Obtención de la lipasa de *R.miehei*

Como se indicó anteriormente, esta lipasa se obtuvo inicialmente por fermentación del hongo *Rhizomucor miehei*¹⁷². Tras el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética la lipasa de *Rh.miehei* se obtiene actualmente por técnicas de recombinación genética, siguiendo la estrategia que se representa en el esquema 17¹⁷⁵.



Esquema 17: Estrategia de clonaje para obtener la lipasa de *Rh. miehei*

El cADN correspondiente al precursor de la lipasa de *Rh. miehei* se insertó en un plásmido de expresión de *A. oryzae*¹⁷⁶, denominado pRML-787 que presenta un promotor de *A. oryzae* α -amilasa, un terminador de *A. niger* glucoamilasa y un marcador genético de acetamidasa, que permite el crecimiento de las células en medios donde la única fuente de nitrógeno es la acetamida. En la Figura 12 se representa la estructura de la molécula recombinante obtenida.

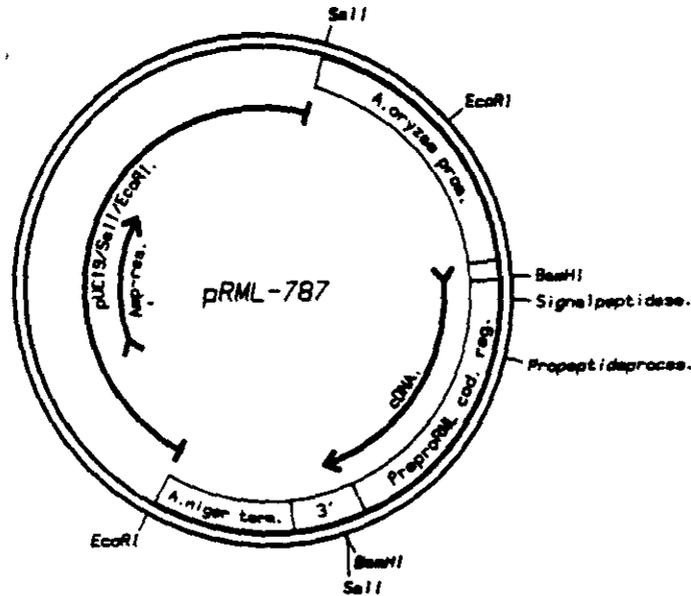


Figura 12: Molécula recombinante constituida por el plásmido pRML-787 y el cADN correspondiente a la lipasa de *Rh.miehei*.

Esta molécula recombinante se introdujo en la célula hospedadora de *A.oryzae* por un proceso de transformación, obteniéndose un clon de células, productoras de la lipasa de *Rh.miehei*. Tras el estudio de las proteínas secretadas por el clon de células se observó que una gran proporción correspondía a lipasa de *Rh.miehei* (rRML). La composición en aminoácidos, el peso molecular y la actividad enzimática específica de esta lipasa recombinante (rRML) resultó ser semejante a la de la lipasa de *Rh.miehei* obtenida por fermentación del hongo (RML).

El mecanismo de maduración de la lipasa de *Rh.miehei* en las células transformantes no se conoce, pero se comprobó que el 70% de la lipasa secretada por *A.oryzae* era correctamente madura, es decir, había perdido la secuencia de aminoácidos característica del precursor; mientras que el restante 30% había perdido el residuo de serina N-terminal¹⁷⁷.

A partir de la estructura de los dos cADN aislados de esta lipasa³⁶ se llegó a la conclusión de que la lipasa de *Rh.miehei* es sintetizada como un precursor de 363 aminoácidos (peso molecular de 39.529 D) que presenta una señal peptídica de 24 aminoácidos y un propeptido de 70 aminoácidos. Tras un proceso de maduración, todavía desconocido, la lipasa de *Rh.miehei* queda constituida por 269 aminoácidos (peso molecular de 29.472 D) coincidiendo con el estudio de la secuencia de aminoácidos realizado con la

lipasa purificada¹⁷⁷. Esta secuencia de aminoácidos (utilizando la nomenclatura estándar de tres letras) se representa en la Figura 13, comparándola con la secuencia de nucleótidos del cADN, correspondiente a la pre-lipasa de *Rh.miehei*³⁶.

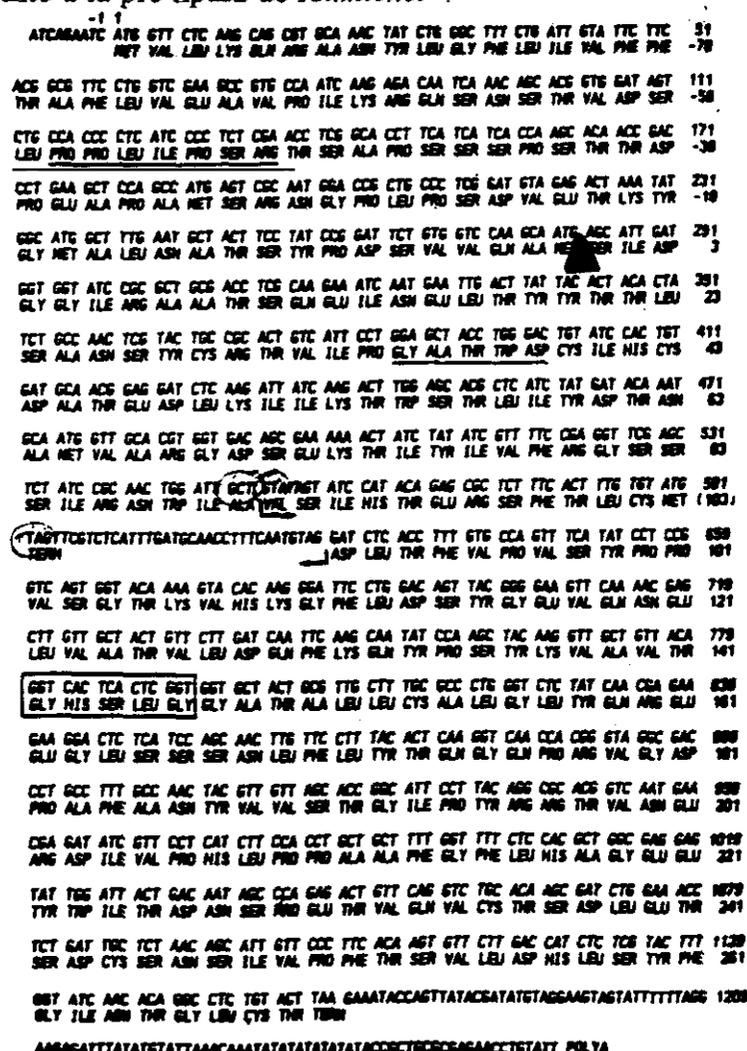


Figura 13 : Secuencia de aminoácidos de la lipasa de *Rh.miehei* y secuencia de nucleótidos de su cADN.

Los nucleótidos se numeran a partir de la primera base del codon iniciador (ATG) y los aminoácidos se numeran a partir del primer residuo de la lipasa madura, dando números negativos a los 94 aminoácidos del precursor que se pierden tras la maduración. Una flecha indica la posición del primer aminoácido de la lipasa madura. El aminoácido Met-103 es el residuo carboxi terminal de una corta lipasa variante del precursor. El pentapéptido donde se encuentra la triada catalítica está marcado por un rectángulo

Lipasa de *Rhizomucor miehei*

En la Tabla 3 se muestra la composición en aminoácidos de la lipasa de *Rh.miehei* (en sus formas A (RML-A) y B (RML-B)), deducida a partir de la secuencia de nucleótidos del correspondiente cADN y de la lipasa secretada por *A.oryzae* tras el proceso de transformación genética (rRML), que es muy similar para todas ellas^{177,36}.

Tabla 3: Composición en aminoácidos de la lipasa de *Rh.miehei* en sus formas A y B, del correspondiente cADN y de la lipasa obtenida por técnicas de clonaje (rRML).

AMINOACIDO	RML-A	RML-B	cADN	rRML
Asp/Asn	28	29	26	29
Thr	26	26	27	25
Ser	29	26	25	24
Glu/Gln	21	23	21	25
Pro	19	14	13	14
Gly	17	21	20	19
Ala	19	19	18	18
Cys-SH	6	6	7	7
Val	20	21	21	21
Met	3	1	1	1
Ile	14	16	17	16
Leu	22	22	22	22
Tyr	14	15	15	14
Phe	8	10	10	10
Lys	7	8	7	8
His	5	6	6	6
Trp	3	4	3	4
Arg	10	10	10	10
TOTAL	271	277	269	273

Por todo ello, se puede concluir que el mecanismo responsable de la maduración del precursor de esta lipasa presenta la misma especificidad en *Rh.miehei* y en *A.oryzae*³⁶. Asimismo, el punto isoeléctrico de la lipasa recombinante (rRML) purificada es 4,3, semejante al de la forma B³⁶.

II.3.3.- ESTRUCTURA DE LA LIPASA DE *Rhizomucor miehei*

En 1990 Brady y cols.⁵⁸ cristalizaron la lipasa de *Rhizomucor miehei* y estudiaron su estructura mediante la técnica de rayos-X. De esta forma, describieron el modelo atómico obtenido con una resolución de 3,1 Å (posteriormente refinado hasta 1,9 Å). La descripción de la estructura de esta lipasa fue completada por Derewenda y cols.¹⁷⁸, los cuales analizaron la estructura de un complejo enzima-inhibidor, para así poder estudiar las diferencias estructurales entre las distintas conformaciones de la lipasa.

Una vez conocida la estructura completa de la lipasa de *Rh.miehei* se llevaron a cabo estudios más profundos acerca del proceso de activación, simulando el movimiento de la "tapadera", elemento característico de las lipasas¹⁷⁹. Para estos estudios se utilizaron técnicas de mecánica molecular, con las que se pudo simular el movimiento de la "tapadera" mediante ángulos pseudotorsionales restringidos, en vacío, para simular el medio hidrofóbico de la interfase lipídica o del disolvente orgánico, con distintos valores de constante dieléctrica.

Estos estudios revelaron algunas similitudes importantes con las serín proteasas, como son la existencia de una triada catalítica (Ser...His...Asp) y de una cavidad oxianiónica en el que participan los nitrógenos de algunos residuos. Además, se descubrió la existencia de una estructura α -helicoidal que actúa como una "tapadera", cubriendo la triada catalítica y que desempeña un papel fundamental en el proceso de activación de la lipasa, ya que, cuando la enzima se encuentra en la interfase oleo-acuosa, fundamental para su activación, esta "tapadera" se abre y deja al descubierto una gran zona hidrofóba, donde se encuentra el centro activo de la enzima.

La estructura de la lipasa de *Rh.miehei* sirvió como base para el estudio estructural de otras lipasas homólogas, toda ellas producidas por hongos. Dichas lipasas son las producidas por *Geotricum candidum*, *Humicola lanuginosa*, *Penicilium camembertii* y *Rhizopus delemar*⁴⁶.

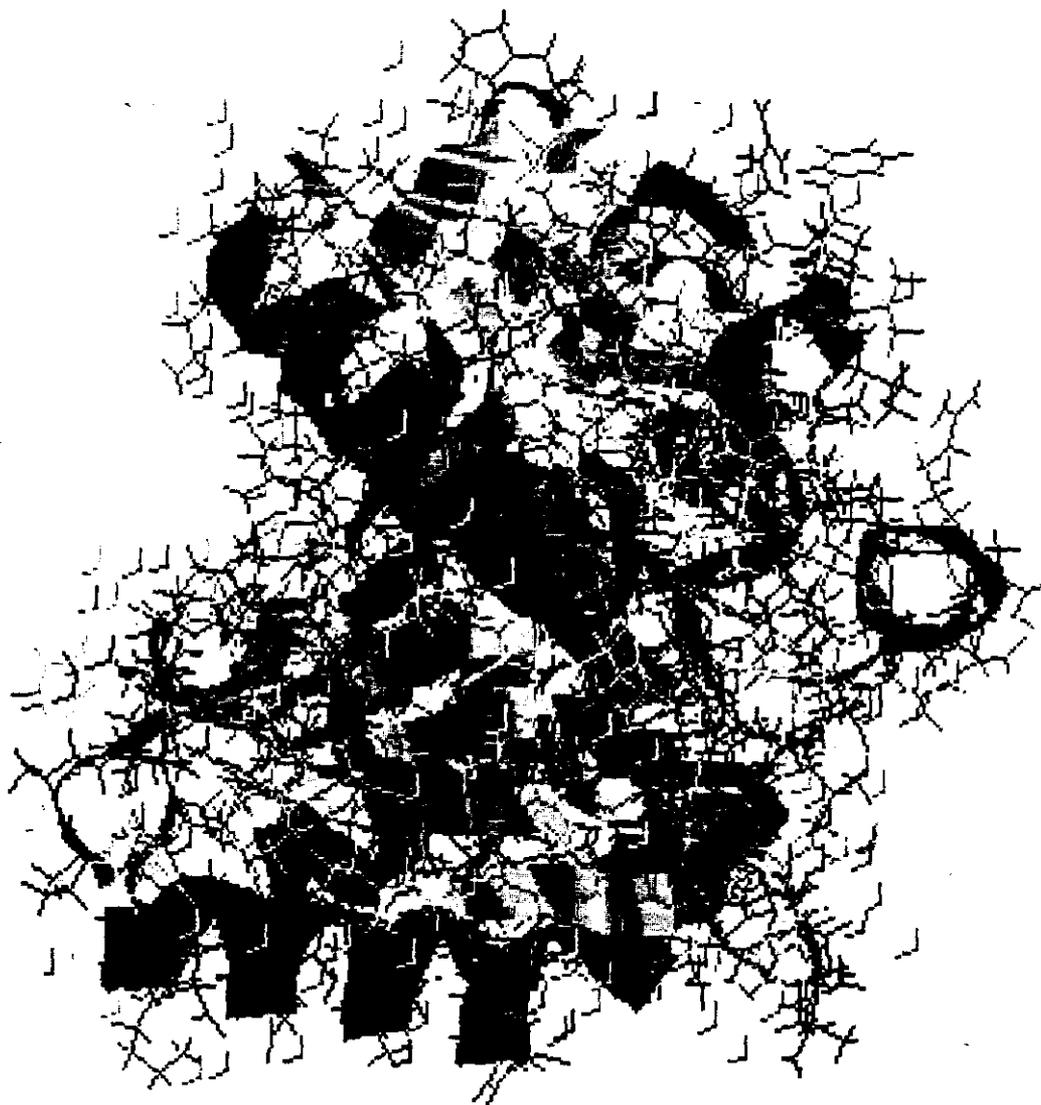


Figura 14: Estructura de la lipasa de *Rhizomucor miehei* obtenida del Banco de Datos Protéicos.

II.3.3.a.- Características generales

La lipasa de *Rh.miehei* está constituida por una cadena protéica sencilla compuesta por 269 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 30 kD³⁸

Brady y cols.³⁸ cristalizaron esta lipasa obteniendo cristales con la simetría del grupo espacial P2₁2₁2₁. La celdilla unidad tiene las siguientes dimensiones: $a = 71,6 \text{ \AA}$, $b = 75,0 \text{ \AA}$, $c = 55,0 \text{ \AA}$. Si se considera una molécula por celdilla, el volumen específico es de $2,5 \text{ \AA}^3$ por dalton.

En el mapa de densidad electrónica de la estructura cristalina de la lipasa de

Rh.miehei, realizado por Brady y cols.⁵⁸, se definieron vagamente dos fragmentos: el fragmento N-terminal, que comprende los 13 primeros aminoácidos y un largo bucle externo entre los residuos 36 y 48. Posteriormente, Derewenda y cols.¹⁷⁸ descubrió que la hélice α N-terminal actúa como soporte para la parte distal de la lámina.

Las coordenadas atómicas de la posición de cada uno de los aminoácidos de la lipasa de *Rh.miehei*, así como su estructura terciaria fueron depositadas por Brady y cols. en el Banco de Datos Protéicos⁵⁸, del cual se ha obtenido la siguiente representación (Figura 14).

II.3.3.b.- Estructura primaria

En la Tabla 4, publicada por Derewenda y cols.¹⁷⁸ en 1992, se recogen los 269 residuos aminoacídicos de la lipasa de *Rh.miehei* y su posición en la cadena polipeptídica. Además, se indican los ángulos dihedros del esqueleto protéico, las asignaciones de la estructura secundaria, obtenidas a través del algoritmo DSSP¹⁸⁰; las asignaciones finales basadas en los ángulos dihedros y en el sistema de enlace por puentes de hidrógeno y, por último, el grado de exposición al medio de cada residuo, expresado en Å^2 .

Tabla 4: Estructura de la lipasa de *Rhizomucor miehei*. Secuencia de aminoácidos, ángulos dihedros, puentes de hidrógeno, estructura secundaria y grado de accesibilidad de los aminoácidos al medio.

Residue	Dihedral angles (°)		Main-chain hydrogen bond		Secondary structure	Accessibility (Å^2)	
	ϕ	ψ	C=O	N			
5	G	162	236 N	→	 β (8°) 	82	
6	I	-127	→	→		82	
7	R	-150	234 N	234 O		100	
8	A	-89	7 N ⁷¹	→		74	
9	A	-79	WAT	232 O		β	15
10	T	-83	(13 N, 14 N)	13 O ⁴¹		β	71
11	S	-59	(14 N, 15 N)	WAT			93
12	Q	-61	(15 N, 16 N)	WAT			141
13	E	-64	17 N	10 OG1			34
14	I	-64	(18 N, 18 O ⁹)	(10 O, 11 O)			24
15	N	-61	(19 N, WAT)	(11 O, 12 O)		103	
16	E	-67	(19 N, 20 N)	12 O		58	
17	L	-64	(21 N, 21 O ⁷ , WAT)	13 O		4	
18	T	-74	(21 N, 22 O ⁷ , 22 N)	14 O	 α (1) 	34	
19	Y	-60	(23 N)	(15 O, 16 O)		51	
20	Y	-66	(23 N)	(15 O, 16 O)		12	
21	T	-59	(25 N)	(17 O, 18 O)		0	
22	T	-62	(25 N, 26 N)	18 O		12	
23	L	-59	{WAT, 27 N?(3.2 Å)}	19 O		3	
24	S	-56	(27 O ⁷ , WAT)	20 O		0	
25	A	-63	(28 N, WAT)	21 O		2	
26	N	-60	29 N	22 O		3	
27	S	-66	WAT	23 O?(3.3 Å)		0	
28	Y	-83	30 NH1	25 O	 γ _N β	11	
29	C	-84	(32 N, 33 N)	26 O		5	

Lipasa de Rhizomucor miehei

Residue	Dihedral angles (°)		Main-chain hydrogen bond		Secondary structure	Accessibility (Å ²)	
	φ	ψ	C=O	N			
30	R	-63	-23	35 N	WAT	α _R	142
31	T	-77	-15	(37 N, 37 O')	→	α _R	53
32	V	-89	-54	36 N	29 O	α _R	0
33	I	-129	113	WAT	29 O	β	0
34	P	-93	10	WAT		γ _R	72
35	G	-52	-38	WAT	30 O	α _R	43
36	A	68	35	(WAT, WAT)	32 O	α _L	40
37	T	-136	168	→	31 O	β	64
38	W	-103	42	WAT	WAT	γ _R	30
39	D	-89	79	(31 O', WAT)	→	δ	121
40	C	-161	161	→	→	β	27
41	I	-61	-47	→	(WAT, WAT)	α _R	145
42	H	-93	22	(26 N', WAT)	WAT	γ _R	65
43	C	-84	-11	47 N	40 O'(3.2 Å)	α _R	0
44	D	-63	-26	WAT	44 O ⁴²	α _R	103
45	A	-60	-39	WAT	→	α _R	47
46	T	-119	12	49 N	43 O'(3.3 Å)	γ _R	0
47	E	-68	-6	WAT	43 O	α _R	115
48	D	-90	1	WAT	48 O ⁴¹	γ _R	83
49	L	-85	140	(38 N', WAT)	46 O	β	4
50	K•	-88	119	68 N	68 O		112•
51	I	-73	108	WAT	WAT		17
52	I	-75	-43	WAT	66 O		51
53	K•	-174	155	66 N	66 O	β (1)	83•
54	T	-131	155	WAT	→		24
55	W	-137	149	64 N	64 O		24
56	S	-140	94	→	WAT		43
57	T	-69	153	61 N	62 O	β	20
58	L	-72	-43	WAT	WAT	α _R	168
59	I	-92	-40	(WAT, WAT)	117 O ⁴¹	α _R	126
60	Y	-103	-2	WAT	117 O ⁴²	γ _R	100
61	D	55	45	(63 N ⁴² , WAT)	57 O	α _L	71
62	T	-79	118	57 N	57 O'	β	9
63	N	-114	120	80 N	WAT		5
64	A	-155	169	55 N	55 O		0
65	M	-154	159	78 N	78 O		1
66	V	-120	129	(52 N, 53 N)	53 O	β (2)	0
67	A	-137	155	76 N	76 O		1
68	R	-123	123	50 N	50 O		26
69	G	-107	106	(73 N, 74 N)	74 O		0
70	D	-68	-45	73 N	WAT	α _R	67
71	S	-67	-30	WAT	WAT	α _R	99
72	E	-87	-12	(74 O', WAT)	→	γ _R	58
73	K•	55	51	173 N	(69 O, 70 O)	α _L	100•
74	T	-138	145	69 N	69 O		2
75	I	-109	123	139 N	137 O		0
76	Y	-102	135	67 N	67 O		6
77	I	-119	124	141 N	139 O	β (3)	0
78	V	-126	133	65 N	65 O		0
79	F	-114	131	WAT	141 O		0
80	R	-87	155	(WAT, WAT)	63 O	β	14
81	G	-85	-161	80 N'	!→!	α	2
82	S	-61	144	WAT	WAT	β	19
83	S	-83	-2	→	WAT	γ _R	59
84	S	-141	69	(87 N, 88 N)	88 O'	δ	55
85	I	-56	-40	89 N	WAT		9
86	R	-59	-44	(90 N, WAT)	WAT(3.2 Å)		143
87	N	-68	-41	91 N	84 O		89
88	W	-56	-45	92 N	84 O	α (2)	37
89	I	-61	-52	WAT	85 O		21
90	A	-53	-41	WAT	86 O		78
91	D	-97	-4	→	87 O		111
92	L	-51	130	WAT	88 O	β	33
93	T	-130	136	WAT(3.4 Å)	WAT	β	103
94	F	-95	134	WAT	→	β	26
95	V	-135	96	109 N	108 N ⁴¹	δ	65
96	P	-63	128	WAT		β	57

Residue	Dihedral angles (°)		Main-chain hydrogen bond		Secondary structure	Accessibility (Å ²)	
	φ	ψ	C=O	N			
97	V	-138	162	107 N	107 O	β (II)	40
98	S	-66	146	WAT	WAT	β	80
99	Y	-91	119	#202 NH2	105 O	β	9
100	P	-60	-44	#202 NH1		α _R	103
101	P	-62	-20	WAT		α _R	67
102	V	-129	106	105 O'		β	30
103	S	-62	143		WAT	β	125
104	G	89	3	WAT		γ _L	62
105	T	-117	148	(99 N, WAT, WAT)	102 O?(3.3 Å)	β	7
106	K•	-127	144	181 N	181 O ⁴¹	β	90•
107	V	-133	162	97 N	97 O	β (III)	0
108	H	-77	129	111 N	179 O	β	11
109	K•	-53	-45	113 N	95 O		78•
110	G	-57	-38	(114 N, WAT, 114 O')			25
111	F	-70	-43	115 N	108 O		2
112	L	-65	-45	116 N	108 O?(3.3 Å)		37
113	D	-63	-44	{117 N?(3.2 Å), WAT}	109 O		40
114	S	-57	-51	62 O'	110 O		12
115	Y	-62	-47	(118 N, 119 N)	111 O		7
116	G	-44	-50	WAT	112 O		36
117	E	-60	-36	WAT	113 O?(3.3 Å)		59
118	V	-102	-17	122 N	115 O		4
119	Q	-38	-57	123 N	115 O	α (3)	57
120	N	-55	-56	WAT	WAT		124
121	E	-68	-37	(125 N, 125 O')	WAT		106
122	L	-64	-50	(125 N, 126 N)	118 O		0
123	V	-58	-43	127 N	119 O		3
124	A	-62	-40	(128 N, WAT)	120 O		57
125	T	-64	-40	129 N	121 O		28
126	V	-71	-40	130 N	122 O		0
127	L	-66	-34	131 N	123 O		29
128	D	-63	-45	132 N	124 O		83
129	Q	-71	-38	133 N	125 O		16
130	F	-69	-34	133 N	126 O		21
131	K•	-64	-37		127 O		144•
132	Q	-77	-30	(WAT, WAT)	128 O		115
133	Y	-131	66	136 N	(129 O, 130 O)	δ	62
134	P	-60	-19	WAT		α _R	88
135	S	-84	-12	(WAT, WAT)	WAT	γ _R	90
136	Y	-83	164	WAT	133 O	β	20
137	K•	-94	160	75 N	73 O		0•
138	V	-115	114	170 N	168 O		0
139	A	-118	130	77 N	75 O		0
140	V	-109	126	172 N	170 O	β (4)	0
141	T	-143	156	79 N	77 O		0
142	G	-172	145	174 N	!→!		0
143	H	-105	144	146 N	WAT		0
144	S	62	-121	147 N	174 O	ε	0
145	L	-57	-39	(148 N, 149 N)	WAT?(3.3 Å)	α _R	30
146	G	-56	-35	(150 N, 149 O')	143 O		0
147	G	-70	-39	151 N	144 O		0
148	A	-71	-45	152 N	145 O		0
149	T	-67	-36	153 N	145 O		3
150	A	-60	-43	154 N	146 O		0
151	L	-66	-49	155 N	147 O		3
152	L	-59	-38	(156 N, WAT)	148 O	α (4)	2
153	C	-59	-51	147 N	149 O		0
154	A	-61	-39	158 N	150 O		0
155	L	-67	-42	159 N	151 O		1
156	D	-58	-50	160 N	152 O		12
157	L	-56	-44	(160 N, WAT)	153 O		0
158	Y	-64	-38	(161 N, WAT)	154 O		69
159	Q	-68	-37	WAT	155 O		49
160	R	-61	-16	WAT	(156 O, 157 O)	α _R	90
161	E	34	74	WAT	158 O	α _L	166
162	E	-119	20		WAT	γ _R	115
163	G	103	-6	(168 N ²² , WAT)	WAT	γ _L	54

Residue	Dihedral angles (°)		Main-chain hydrogen bond		Secondary structure	Accessibility (Å ²)	
	φ	ψ	C=O	N			
164	L	-95	121	(WAT, WAT)	WAT	β	5
165	S	-145	-170	(168 N, 169 N)	168 O ¹	β	44
166	S	-64	-14	WAT	WAT	α _R	50
167	S	-91	-12	→	165 O'	α _R	90
168	N	-137	16	138 N	165 O	γ _R	26
169	L	-124	122	→	165 O	β	0
170	F	-123	137	140 N	138 O	β (5)	37
171	L	-123	136	196 N	194 O	β (5)	1
172	Y	-133	125	142 N?(3.3 Å)	140 O	β (5)	6
173	T	-124	155	196 N	196 O	β (5)	0
174	Q	-131	130	144 N	142 O	β (5)	2
175	G	56	35	→	198 O	β (5)	0
176	Q	-82	136	WAT	WAT	α _L	0
177	P	-76	162	176 N ²	WAT	β	3
178	R	-65	144	→	206 O	β	0
179	V	-104	-37	108 N	WAT	β	3
180	G	-144	-178	216 N	WAT?(3.3 Å)	α _R	2
181	N	-81	-176	(184 N, 185 N)	106 O	β	0
182	P	-53	-44	(186 N, 186 N ²)	→	β	30
183	A	-62	-41	(187 N, WAT)	→	β	57
184	F	-70	-37	188 N	181 O	β	41
185	A	-60	-40	189 N	181 O	β	5
186	N	-62	-40	(190 N, WAT)	182 O	α (5)	0
187	Y	-61	-44	(190 N, 190 O')	183 O	α (5)	84
188	V	-59	-45	(131 N, 191 O', WAT)	184 O	α (5)	40
189	V	-61	-43	(192 N, WAT)	185 O	α (5)	7
190	S	-55	-24	WAT	186 O	α (5)	47
191	T	-77	-17	(158 OH)	188 O	α (5)	85
192	G	74	-4	WAT	189 O	α (5)	4
193	I	-59	127	(WAT, WAT)	191 O ¹	γ _L	45
194	P	-60	118	171 N	191 O ¹	β	14
195	Y	-127	103	220 N	WAT	β	34
196	R	-100	109	(173 N, WAT)	197 O	β	10
197	R	-94	104	222 N	220 O	β (6)	55
198	T	-88	134	(175 N, WAT)	173 O	β (6)	4
199	V	-127	132	224 N	222 O	β (6)	1
200	N	-98	105	203 N	260 OH	β (6)	1
201	E	41	-111	(223 N, WAT)	224 O	β (6)	5
202	R	-96	7	253 N	256 O ²	ε	49
203	D X	-36	117	WAT	200 O	γ _R	116
204	I	-71	-23	207 N	253 O	β	0
205	V	-58	-47	208 N	203 O ²	α _R	35
206	P	-59	-11	(217 N ² , WAT)	→	α _R	0
207	H	-107	14	WAT	204 O	α _R	1
208	L	-113	139	178 N	205 O	γ _R	16
209	P	-76	161	(178 NH ₁ , WAT)	→	β	36
210	P	-51	143	(213 N, WAT)	→	β	1
211	A	-45	-466	WAT	WAT?(3.3 Å)	β	77
212	A	-56	-34	WAT	WAT	α _R	69
213	F	-66	-17	WAT	210 O	α _R	101
214	G	114	-2	WAT	→	α _R	87
215	F	-91	167	(WAT, WAT)	WAT?(3.3 Å)	γ _L	35
216	L	-156	149	WAT	180 O	β	13
217	H	-92	146	240 N	240 O ²	β	49
218	A	-120	170	197 N'	WAT?(3.3 Å)	β	3
219	G	96	140	→	238 O	β	5
220	S	-67	122	197 N	195 O	@	3
221	E	-82	117	235 N	→	β (7)	16
222	Y	-103	104	199 N	197 O	β (7)	4
223	W	-105	115	233 N	233 O	β (7)	8
224	I	-73	116	201 N	199 O	β (7)	24
225	T	-105	-17	(WAT, 226 O ¹ ?)	231 O	β (7)	0
226	D	-157	152	231 N	231 O?(3.4 Å)	γ _R	50
227	N	-108	-15	WAT?(3.3 Å)	→	β	73
228	S	-144	109	→	→	γ _R	57
229	P	-75	158	231 O'	→	δ	112
230	E	-58	122	WAT	→	β	103
						β	59

Residue	Dihedral angles (°)		Main-chain hydrogen bond		Secondary structure	Accessibility (Å ²)	
	ϕ	ψ	C=O	N			
231	T	-125	133	225 N	226 O	61	
232	V	-127	128	(9 N, WAT)	WAT	4	
233	Q	-103	130	223 N	223 O	51	
234	V	-111	124	7 N	7 O	0	
235	C	-104	109	WAT	221 O	1	
236	T	-70	-15	WAT	5 O	57	
237	S	-58	139	WAT	WAT	50	
238	D	-78	-8	219 N	→	α _R	85
239	L	-114	156	(237 O', WAT)	237 O'	β	48
240	E	-55	136	→	217 O	β	36
241	T	-125	173	246 N ⁴²	WAT	β	29
242	S	-98	6	WAT	WAT(3.3 Å)	γ _R	86
243	D	-93	8	233 N ⁴²	61 O	γ _R	84
244	C	-109	-128	(247 N, 247 O')	WAT	@	0
245	S	-50	-26	248 N	221 O ⁴²	α _R	2
246	N	-66	-17	→	WAT	α _R	35
247	S	-66	-15	WAT	244 O	α _R	71
248	I	-98	-5	251 N	245 O	γ _R	28
249	V	-67	142	WAT	→	β	65
250	P	-88	19	(252 N, WAT)	→	γ _R	95
251	F	-91	73	202 NH1	248 O	δ	144
252	T	-93	174	(WAT, WAT)	250 O	β	50
253	S	-134	137	204 N	202 O	β	26
254	V	-84	-44	257 N	# 39 O ⁴²	β	50
255	L	-62	-29	258 N	# 39 O ⁴²	β	117
256	D	-63	-18	200 N ⁴²	253 O'	α (β)	30
257	H	-72	-33	(265 O', 143 N ⁴²)	254 O	β	0
258	L	-83	2	(265 N, 264 N ⁴¹)	255 O	β	22
259	S	-147	126	200 N ⁴²	→	β	48
260	Y	-130	125	263 N	263 O	β	0
261	F	58	33	WAT	WAT	α _L	17
262	G	84	-7	WAT	WAT	γ _L	62
263	I	-101	133	260 N	260 O	β	21
264	N	-69	126	WAT	WAT	β	33
265	T	-121	105	→	258 O	δ	0
266	G	128	-23	WAT	WAT	@	12
267	L	-128	6	(269 N, 264 O ⁴¹)	(264 O ⁴¹ , WAT)	γ _R	90
268	C	51	47	WAT	→	α _L	48
269	T	-98	4	WAT	267 O	γ _R	84

Simbolos: | lámina β; ¶ hélice α; → grupo amida o carbonilo libre; !-→! grupo amida o carbonilo libre oculto; @ conformación Ramachandran no permitida; (β) puente β; = codo de la hélice; # átomos de moléculas con relación de simetría

II.3.3.c.- Estructura secundaria

La lipasa de *Rh.miehei* está formada por 269 aminoácidos, de los cuales 130 (48,3 %) forman parte de láminas o de hélices y el resto de los residuos (51,7 %) están situados en las horquillas β y en los largos bucles superficiales.

En la Figura 15 aparece una representación esquemática de la estructura secundaria de la lipasa de *Rh.miehei*.

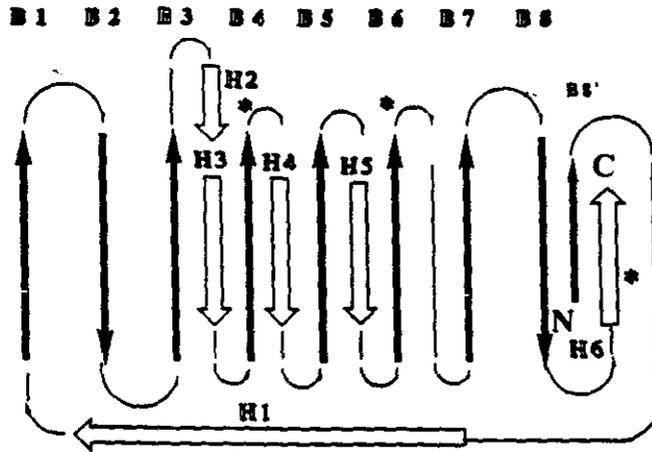


Figura 15: Esquema de la estructura secundaria de la lipasa de *Rh.miehei*

II.3.3.c.1.- Zona central de láminas β

En la Figura 16 aparecen representados los puentes de hidrógeno entre los grupos peptídicos que forman parte de la zona central de láminas β .

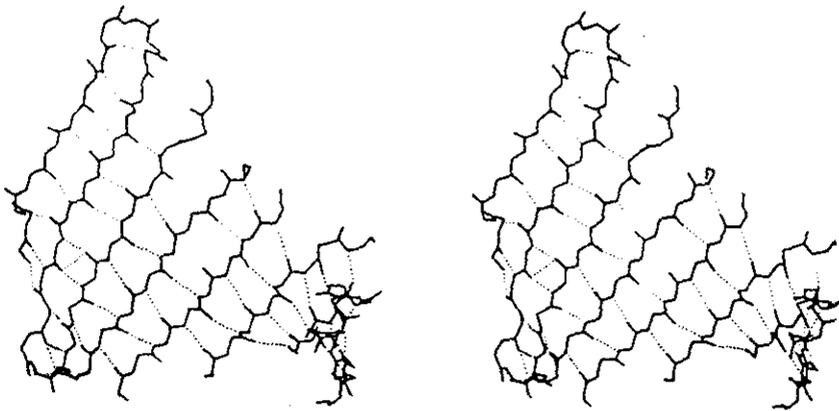


Figura 16: Zona central de láminas β de la lipasa de *Rh.miehei*

La notación usada para las hebras β (1-8), de la hoja central, sigue la secuencia de éstas; excepto para la novena hebra, que se denomina $8'$.

De las nueve hebras, siete de ellas se disponen en una dirección y solo dos se colocan en la dirección opuesta. Además, las cinco hebras centrales constituyen una hoja paralela continua.

Asimismo, aparecen dos clásicos abombamientos β , como los descritos por Richardson¹⁸¹, entre un estrecho par de enlaces de hidrógeno sobre un par de hebras antiparalelas. El primero de estos abombamientos aparece en la hebra 1 y en él participa el residuo Ile-52, el cual presenta una conformación helicoidal. El segundo abombamiento se encuentra en un medio estructuralmente semejante, al final de la hebra 7, donde el residuo Thr-225, adopta una conformación γ_R .

II.3.3.c.2.- Hélices α

Hay cinco hélices α que contienen, al menos, cuatro aminoácidos consecutivos con conformación α_R . Estos fragmentos son los siguientes: del 11 al 27; del 85 al 91; del 109 al 132; del 146 al 159; del 182 al 191 y del 254 al 257.

La hélice α más larga (109-132) presenta un pronunciado doblez originado por el residuo Val-18, el cual adopta una conformación γ_R . Como resultado, se ven afectados tanto el sistema de puentes de hidrógeno, como los oxígenos de los grupos carbonilo de Gly-116, Glu-117 y Asn-120 y los grupos amido de la cadena principal (Asn-120 y Glu-121), los cuales participan solamente en los puentes de hidrógeno con moléculas de agua. No se ha encontrado nada en la secuencia alrededor del doblez que sugiera que este hecho es resultado de la esteroquímica local. Es posible que el doblez se haya formado al final del proceso de doblaje, cuando la larga hélice α se une al centro de la molécula.

Además, hay regiones muy helicoidales, las cuales no son clasificadas como hélices continuas debido a sus grandes irregularidades. Los dos fragmentos más largos de este tipo se encuentran entre los residuos 41-48 y 242-248.

II.3.3.c.3.- Horquillas β y bucles

El carácter predominantemente paralelo de las láminas β implica que la mayoría de las conexiones entre las hebras sean del tipo β - α - β dextrógiras.

Solamente hay tres pares de hebras antiparalelas contiguas que están unidas por medio de horquillas β ; estas hebras son las siguientes: 1-2, 2-3 y 7-8.

En la lipasa de *Rh.miehei* aparecen cuatro largos bucles superficiales, los cuales no tienen una estructura secundaria definida. Estos bucles se encuentran entre los siguientes residuos: del 28 al 49 (es el bucle que conecta la hélice N-terminal con la primera hebra de

la hoja β); del residuo 92 al 108 (conecta la "tapadera" con la hélice 3); del 160 al 168 (conecta la hélice 4 con la hebra 5) y del residuo 201 al 219 (es el bucle que une dos hebras contiguas (6 y 7)). Todos estos bucles presentan las características de los bucles Ω , definidos por Leszczynski y Rose¹⁸². Estos bucles están formados por menos de la cuarta parte de los residuos de la lipasa (24,1 %), pero ocupan el 32 % del área superficial.

Lo más novedoso de estos bucles se encuentra en el segundo de ellos, entre los residuos 92 y 108, que conecta el extremo C-terminal de la "tapadera" con la hélice 3. Este bucle tiene una cabeza retorcida debido a dos prolinas que participan en un puente antiparalelo entre las posiciones 87 y 107. Este extremo N-terminal interviene en el reordenamiento conformacional que tiene lugar durante la activación enzimática.

También hay dos extensos fragmentos polipeptídicos, cuya ausencia define la pérdida de la estructura secundaria; dichos fragmentos aparecen entre los residuos 175 a 181 y 236 a 253. El primero de ellos se sitúa en el interior de la molécula y conecta la hebra 5 de la lámina central con la "tapadera"; el segundo fragmento, forma parte de la zona C-terminal y se sitúa en una zona superficial de la molécula.

II.3.3.d.- Estructura terciaria

La lipasa de *Rh.miehei*, según la clasificación de proteínas en función de su estructura secundaria¹⁸³, es una proteína de estructura tipo α/β ¹⁸¹; en la que se alternan las dos estructuras: fragmentos con estructura de hélice α y con estructura de lámina β . Dichos fragmentos se disponen de forma que las láminas β se colocan en la zona central hidrófoba y las hélices α se disponen alrededor protegiendo y estabilizando la estructura protéica.

Las hélices α forman una serie de horquillas, bucles y segmentos helicoidales que unen o empaquetan la zona central de láminas β ¹⁷⁸. Todos estos bucles son dextrógiros; con lo que se crea una situación poco común, en la cual la lámina central es asimétrica, quedando todos los fragmentos enlazantes (hélices α) localizados en un lado de la hoja.

La zona central de láminas β paralelas, está formada por 8 hebras y una pequeña hebra adicional, denominada (8'). Esta zona de láminas β plegadas es muy similar a la de la carboxipeptidasa A¹⁸⁴, aunque la hebra 7 de la lipasa está en dirección opuesta a la de la carboxipeptidasa A.

En la lipasa de *Rh.miehei*, sobre la hoja de láminas β se dobla una hélice α N-

terminal, que se une a la zona más distal de la hoja a través de un corto pentapéptido N-terminal (residuos del 5 al 9), que constituye la pequeña hebra adicional (8') antes mencionada¹⁷⁸. Esta pequeña hebra 8', a su vez, está unida por puentes de hidrógeno al extremo C-terminal de la octava hebra grande, en el extremo de la hoja central. Este patrón de plegamiento de la lipasa de *Rh.miehei* constituye un interesante vínculo evolutivo entre las proteínas del sistema tipo α/β paralelo y las del tipo barril β .

Un largo bucle superficial (residuos del 80 al 109) conecta el extremo C-terminal de la hebra 3 con el extremo N-terminal de un largo doblez helicoidal que se dirige hacia la hebra 4⁶⁰. Este bucle, en principio, se podría clasificar como un gran bucle Ω según la definición clásica, dada por Leszczynski¹⁸².

II.3.3.d.1.- Puentes disulfuro

El plegamiento de la cadena polipeptídica de la lipasa de *Rh.miehei* se estabiliza a través de tres puentes disulfuro: Cys40-Cys43; Cys29-Cys268 y Cys235-Cys244⁵⁸.

Todos estos enlaces son dextrógiros, aunque no pertenecen a ningún patrón estándar de enganches y espirales dextrógiros¹⁸¹.

Estos enlaces disulfuro se colocan en una zona bastante superficial de la molécula, excepto el enlace Cys235-Cys244 que está oculto hacia el interior.

El enlace Cys29-Cys268 estabiliza el plegamiento global de la estructura; mientras que, el enlace Cys235-Cys244 es necesario para estabilizar las dos hebras terminales.

II.3.3.d.2.- Enlaces de las prolinas

En la cadena proteica de esta lipasa aparecen 13 residuos de Prolina, cuatro de los cuales (los residuos 34, 209, 229 y 250) participan en enlaces *cis* peptídicos⁶⁰.

La distribución de estos cuatro residuos de *cis*-Prolina en la lipasa de *Rh.miehei* está de acuerdo con esos intermedios de plegamiento deducidos de la localización de las moléculas de agua internas (ver sección moléculas de agua internas). Es bien conocido que la isomerización de los enlaces imida de la prolina generan fases lentas de plegamiento. El pentapéptido 206-210 (que se sitúa al principio del segmento C-terminal, cubriendo el agrupamiento de 7 moléculas internas de agua) presenta una considerable barrera de energía, ya que tres de sus residuos son prolinas (206, 209 y 210). De la misma forma, la presencia

del residuo Pro-34 supone un paso limitante de la velocidad de formación de un bucle, relativamente rígido, que contiene el puente disulfuro (Cys40-Cys43) y la hélice N-terminal.

II.3.3.e.- Puentes de hidrógeno

II.3.3.e.1.- Puentes de hidrógeno de la cadena principal

En la estructura de la lipasa de *Rh.miehei* aparecen 190 puentes de hidrógeno del tipo O(i)...H-N(j), que representan el 70 % del total posible; esta proporción es ligeramente superior que la proporción del 61 % indicada por Baker y Hubbard¹⁸⁵ para la mayoría de las proteínas de estructura globular. Por otra parte, 68 de estos enlaces aparecen en las hélices α y 66 en puentes paralelos y anti-paralelos. Además, 63 (63,4 %) de los grupos carbonilos están hidratados y los restantes 20 enlaces, que representan el 7,4 %, no pertenecen a ningún sistema de puentes de hidrógeno. En comparación, de todos los grupos NH, solamente 46 (17 %) están hidratados y 20 no participan en puentes de hidrógeno. La proporción de grupos CO y NH no enlazados en la lipasa de *Rh.miehei* es menor que lo indicado por Baker y Hubbard¹⁸⁵ para proteínas globulares, que era del 11,2 % y 12 % respectivamente.

De los grupos ocultos en el interior de la molécula, solamente 4 grupos carbonilo (CO) (residuos 81, 175, 178 y 219) y 2 grupos amino (NH)(residuos 145 y 221) parecen carecer de cualquier sistema de puente de hidrógeno.

Un total de 39 grupos CO (14,5 %) están involucrados en puentes de hidrógeno con átomos de cadenas laterales; 61 (22,7 %) participan en puentes de hidrógeno doblemente bifurcados y 5 (1,8 %) interaccionan con otros tres grupos donadores; en este último tipo de enlaces siempre participan moléculas de agua.

Entre los grupo amino peptídicos, 22 (8,2 %) interaccionan con cadenas laterales y solamente 10 (3,7 %) forman parte de puentes de hidrógeno bifurcados.

Todos estos datos son bastante semejantes al modelo de proteínas globulares descrito por Baker y Hubbard¹⁸⁵.

II.3.3.e.2.- Puentes de hidrógeno de las cadenas laterales y puentes salinos

La estructura secundaria de la lipasa de *Rh.miehei* se estabiliza a través de una serie de puentes de hidrógeno y puentes salinos entre los distintos residuos aminoacídicos de la enzima.

Los puentes salinos se establecen entre cadenas laterales cargadas, predominantemente Arg con Glu o Asp. Una gran mayoría de estas interacciones aparecen en la superficie de la proteína, y solamente 3 grupos y dos pares sencillos (Glu221-Ser245 y Tyr28-His143) están enterrados. Uno de los tres agrupamientos internos pertenece a la triada catalítica y otro es un agrupamiento de tres residuos que se sitúa en la interfase de la hélice N-terminal con la lámina β .

Tabla 5: Puentes de hidrógeno y puentes salinos entre los residuos polares y cargados de la lipasa de *Rh.miehei*¹⁷⁸.

Arg7	N ^{o1}	**	2.7 Å	**	O ^{o2}	Glu13
	N ^{o2}	**	2.5 Å	**	O ^{o1}	Glu13
Glu16	O ^{o1}		3.0 Å		O ^o	Tyr172
Ser24	O ^o		2.7 Å		O ^{o1}	Gln174
			3.0 Å		O ^o	Thr141
Gln174	O ^{o1}		2.9 Å		O ^o	Thr141
Tyr28	O ^o		2.7 Å		N ^{o1}	His143
Ser56	O ^o		2.7 Å		O ^{o1}	Asn63
Asp61	O ^{o2}		2.7 Å		N ^{o2}	Asn63
Arg68	N ^o	**	2.9 Å	**	O ^{o1}	Asp70
	N ^{o1}		2.8 Å		O ^{o1}	Gln129
Asp70	O ^{o1}		2.7 Å		O ^o	Tyr136
Ser71	O ^o		3.0 Å		O ^{o2}	Glu72
Asp48	O ^{o2}	??	2.5 Å	??	O ^{o1}	Glu72
Ser74	O ^o		2.6 Å		N ^o	Lys137
Ser84	O ^o		3.3 Å		O ^{o1}	Asn87
Gln159	O ^{o1}		3.3 Å		O ^o	Tyr99
			3.0 Å		O ^o	Tyr187
Lys109	N ^o	**	2.7 Å	**	O ^{o2}	Asp113
Asp156	O ^{o1}		2.5 Å		O ^o	Tyr115
		**	3.3 Å	**	N ^{o2}	Arg160
		**	3.1 Å	**	N ^o	Arg160
	O ^{o2}		3.0 Å		N ^{o2}	Gln119
Ser144	O ^o	κ	2.7 Å	κ	N ^{o2}	His257
Asp203	O ^{o1}	κ	2.8 Å	κ	N ^{o1}	His257
			2.6 Å		O ^o	Tyr260
Ser165	O ^o		3.2 Å		O ^o	Ser167
Gln176	O ^{o1}		2.9 Å		O ^o	Thr173
			2.5 Å		O ^o	Tyr195
Arg178	N ^o	**	2.8 Å	**	O ^{o2}	Glu240
	N ^{o2}	**	2.7 Å	**	O ^{o1}	Glu240
Asn246	N ^{o2}		3.1 Å		O ^{o1}	Glu240
Glu221	O ^{o1}		2.6 Å		O ^o	Ser

Simbolos: ** puente salino; \square grupo interno de residuos; κ residuos catalíticos; ?? enlace incierto entre dos cadenas laterales.

II.3.3.e.3.- Modificaciones en enlaces de hidrógeno tras la activación enzimática

En la enzima nativa¹⁸³, los residuos del fragmento comprendido entre los restos Ser-82 y Phe-94 participan en puentes de hidrógeno de carácter interno. El grupo hidroxilo de la Ser-82 está enlazado por puente de hidrógeno a la amida de la Ser-84. El fragmento C-terminal de esta región (93-96) es estabilizado por interacciones de los átomos de Val-95 de la cadena principal: el N con N^{δ1} de His y el O con N de Lys-109.

Tras la activación enzimática, la "tapadera" gana tres interacciones adicionales con la zona principal de la molécula de proteína. Así la Ser-82 es estabilizada, en esta nueva conformación por una interacción de un grupo hidroxilo con O^{δ1} del Asp-91. La cadena lateral polar de la Asn-87, ahora enterrada bajo la "tapadera", forma una serie de nuevas interacciones: el O^{δ1} se enlaza con el N de la amida de Thr-93 y Phe-94, mientras el N^{δ2} forma un enlace con el carbonilo de la Tyr-60. El grupo hidroxilo de la Ser-84 forma un puente de hidrógeno con el O^{δ1} del Asp-61. La zona helicoidal central de la "tapadera" retiene su integridad estructural, mediante el oxígeno carbonílico de Il-89 formando un puente de hidrógeno adicional con el hidroxilo de Thr-93. El residuo de Leu-92 se incorpora a la hélice, mientras que la Thr-93 asume la conformación 3_{10} , pasando a ser el último aminoácido de la hélice. El imidazol de la His-108 cambia el puente de hidrógeno con el nitrógeno peptídico de la Val-95 por el enlace al oxígeno carbonílico de la Ala-90, con N^{ε2} involucrado en lugar de N^{δ1}.

II.3.3.f.- Centro activo

El centro catalítico de la lipasa de *Rh.miehei* está constituido por tres elementos¹⁷⁸ que en la Figura 17 se señalan en la estructura general de esta enzima:

A).- la triada catalítica (Ser...His...Asp), que es la responsable del ataque nucleofílico al grupo carbonilo del enlace éster.

B).- la cavidad oxianiónica, que también aparece en las serínproteasas; y que estabiliza el intermedio tetraédrico (sustrato-enzima)

C).- la "tapadera" helicoidal, elemento exclusivo de las lipasas que es la responsable de la activación interfacial de la enzima cuando se encuentra sobre la interfase oleo-ac



Figura 17: Localización de los residuos de la triada catalítica (Ser-144, His-257 y Asp-203) y la Ser-82 del hueco oxianiónico, elementos característicos del centro activo de la lipasa de *Rh.miehei*.

II.3.3.f.1.- Triada catalítica

La triada catalítica de la lipasa de *Rh.miehei* (Ser-144, His-257 y Asp-203) es muy similar a la de las serinproteasas, no solo por los aminoácidos que la constituyen, sino también por el tipo de enlaces, ya que todos los puentes de hidrógeno identificados en este sistema son también característicos de esta constelación en serinproteasas. El N^ε de His está unido por un puente de hidrógeno al O' de Ser; mientras que, el N^{δ1} del grupo imidazol está unido por otro puente de hidrógeno a uno de los oxígenos carboxílicos del Asp y por fuerzas de van der Waals al otro oxígeno carboxílico.

El apareamiento Asp-His aparece en varias familias de enzimas (serinproteasas, esterasas, hidrolasas y oxidorreductasas). La estereoquímica de la pareja Asp-His en la lipasa de *Rh.miehei* es muy típica. El O^{δ1} del residuo Asp-203 forma un enlace de hidrógeno con el N^{α1} de la His-257 (tipo "sin") y otro con un O" del residuo Tyr-260 (tipo "anti"). La estereoquímica de estos dos enlaces es muy favorable e indica fuertes interacciones. Por otro lado, el O^{δ2} del Asp-203 está unido por medio de fuerzas de Van der Waals al N^{δ1} de la His-257 y al N peptídico de la Val-205.

II.3.3.f.2.- Cavity oxianiónica

Este es otro elemento común entre lipasas y serin proteasas. La función de dicha cavity es estabilizar el intermedio tetraédrico enzima-sustrato (Figura 18) formado durante la reacción, en el paso de acilación y deacilación¹⁸⁶.

Brady y cols.⁵⁸ sugirieron que los nitrógenos de los residuos Leu-145 y Gly-146 forman parte de esta cavity. Pero posteriormente, Brzozowski y cols.⁵⁹ y Derewenda y cols.⁶⁰ revelaron que la cavity oxianiónico se forma durante el cambio conformacional, producido durante la activación enzimática, y está **constituido por el enlace peptídico y los grupos hidroxilo de la cadena lateral de Ser-82**. Sin embargo, la estructura exacta de esta cavity oxianiónica es bastante desconocida. Recientemente Norin y cols.¹⁸⁷ lo analizaron por métodos de modelización molecular por ordenador. Estos estudios sugirieron la existencia de 2 regiones dentro de la cavity oxianiónica. Una de estas regiones presenta gran afinidad por grupos alifáticos, y constituye la zona de unión del sustrato, mientras que la otra zona, situada en el lado opuesto, es de naturaleza hidrofílica. En esta última región se almacenan moléculas de agua, que son fundamentales para las reacciones de hidrólisis, ya que, el acceso del agua

a la interfase hidrófoba, donde se sitúa la enzima activa, es muy difícil. El estudio del intermedio acil-enzima indica que esta región hidrofílica se sitúa en una posición muy favorable para el ataque nucleofílico del carbono carbonílico reactivo del grupo acilo.

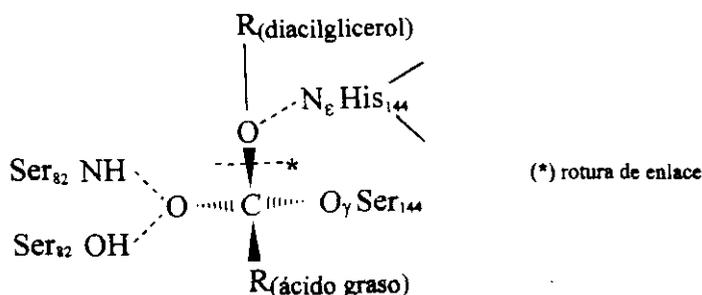


Figura 18: Representación esquemática del intermedio tetraédrico enzima-sustrato de la lipasa de *Rhizomucor miehei*⁵⁹

La lipasa de *Rh.miehei* es un excelente catalizador para la resolución racémica de alcoholes secundarios. Por esta razón Norin¹⁸⁷ también estudió la influencia de la estructura de la cavidad oxianiónica en la enantioselectividad de la lipasa, ya que dicha estructura condicionará la disposición de los enantiómeros en el agujero oxianiónico y la mayor o menor facilidad de ataque nucleofílico. Para estos estudios se hicieron simulaciones de dinámica molecular y minimización energética de los modelos de transición enzima-sustrato, que dieron una idea de la orientación de la unión de los dos enantiómeros de diferentes sustratos (hexanoato de (R,S) 1-feniletilo y hexanoato de (R,S) 2-octilo).

En las estructuras de partida, para la modelización molecular, los radicales más voluminosos de ambos ésteres se colocaron en la misma orientación. La conformación final de mínima energía del enantiómero (R) más reactivo, no era muy diferente de la estructura inicial; los grupos fenilo y hexilo del alcohol liberado estaban perpendiculares al fondo del centro activo; mientras que, los grupos metilo ocupaban una pequeña cavidad en el centro activo. En la lipasa de *Rh.miehei*, esa pequeña cavidad está formada por Gly-266 y la cadena lateral de Tyr-28, His-143, His-257 (componente de la triada catalítica) y Leu-258. El enantiómero (S), menos reactivo se unió de forma distinta al centro activo. En este caso, los grupos metilo se colocaron perpendiculares al fondo del centro activo (como se colocan los grupos voluminosos de los enantiómeros (R)) y los grupos fenilo y hexilo se orientaron a lo largo de la cavidad del centro activo. La energía de interacción de los enantiómeros (S) era

mayor, lo que indica que esos complejos enzima-sustrato eran más tensos que las de los enantiómeros (R) más reactivos. Esta tensión era debida a que en el estado de transición los grandes grupos del enantiómero (S) menos reactivo interactuaban muy desfavorablemente con la enzima.

Además, se analizaron los enlaces de hidrógeno formados entre el oxianión del intermedio tetraédrico y los grupos amida del esqueleto protéico, que se unen por dos puentes de hidrógeno. Estos grupos amida se asignan a los residuos Leu-145 y Ser-82. Asimismo, la cadena lateral de la Serina está unida por otro puente de hidrógeno a la cadena lateral del Asp-91 de la "tapadera".

II.3.3.f.3.- La "tapadera"

Este es un elemento característico de las lipasas. En estas enzimas el centro activo está enterrado bajo una corta hélice superficial (residuos del 85 al 91) que se denomina "tapadera".

El desplazamiento de esta "tapadera" se consideró la base estructural de la activación interfacial de las lipasas⁵⁸. Esta teoría se probó experimentalmente por medio de la caracterización por rayos-X, a una resolución de 3,0 Å, de un complejo de lipasa de *Rh.miehei* con el inhibidor n-hexilfosfonato de etilo y por medio del estudio de los cambios conformacionales observados durante la activación en el complejo enzima-inhibidor (fosfonato de *p*-nitrofenilo), que fueron descritos con una resolución de 2,6 Å⁵⁹.

En la Figura 19 se indica la disposición del residuo Arg-86 en la conformación cerrada de la lipasa de *Rh.miehei*, componente de la tapadera de esta lipasa y que desempeña un papel fundamental en la apertura de la tapadera, ya que como se representa en la Figura 19 su disposición en relación con el esqueleto protéico se modifica por completo al abrirse la tapadera. La estructura abierta de la lipasa de *Rh.miehei* (Figura 20) corresponde al complejo enzima-inhidor (fosfonato de *p*-nitrofenilo).



Figura 19: Estructura **CERRADA** de la lipasa de *Rh.miehei*. El residuo señalado del centro activo es Ser-144 y el residuo de la tapadera es Arg-86.

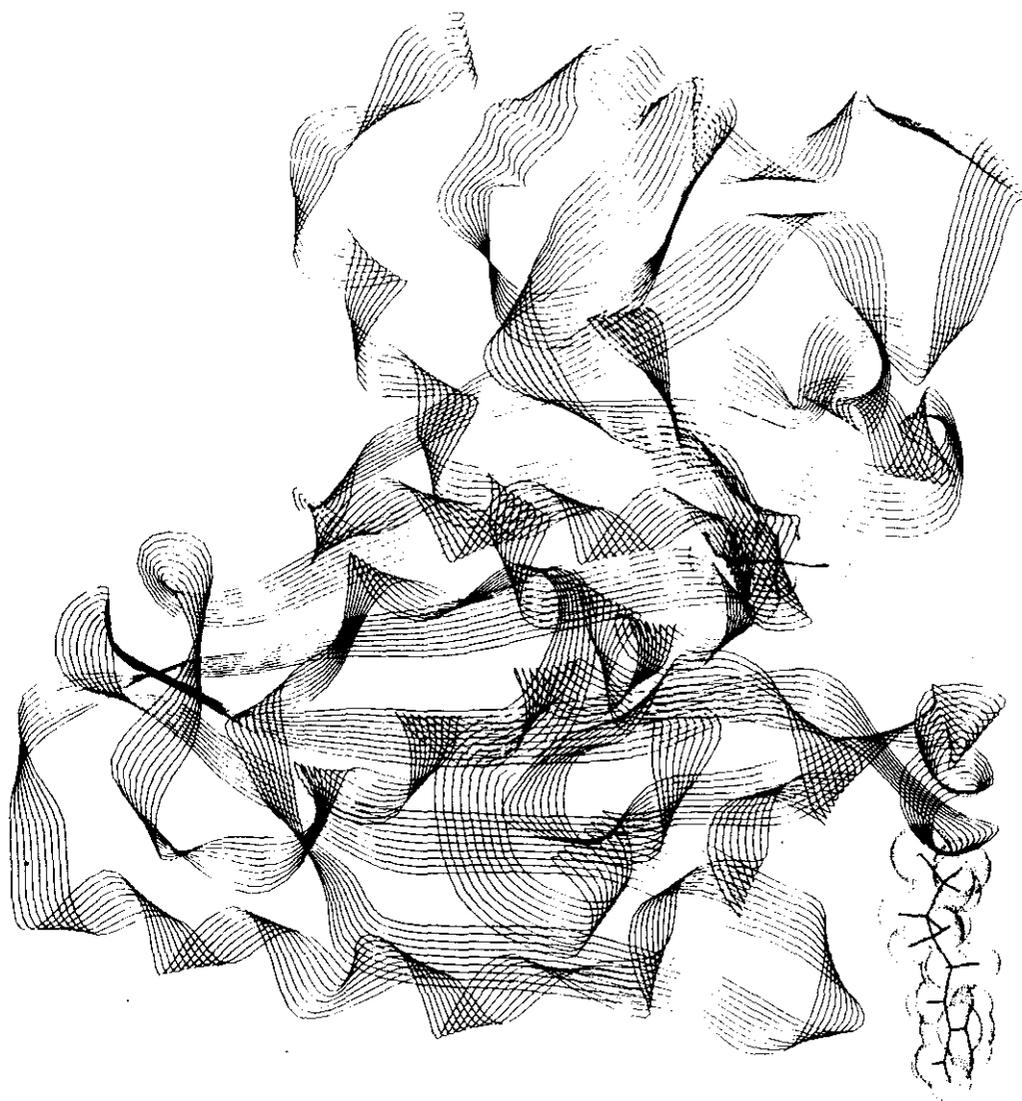


Figura 20: Estructura **ABIERTA** de la lipasa de *Rh.miehei* que corresponde al complejo enzima-inhibidor. Los residuos señalados son Ser-144 del centro activo y Arg-86 de la tapadera..

Brozowski y cols.⁵⁹ analizaron el cambio conformacional de la "tapadera" durante la activación enzimática a través del complejo de la lipasa con un inhibidor (n-hexilfosfonato de etilo). Este cambio conformacional descrito es un simple y rígido movimiento de la parte helicoidal (Leu85-Asp91). Este movimiento consiste en la traslación de 8 Å del centro de gravedad de la hélice y una rotación de 167° alrededor de un eje casi paralelo al eje de la hélice. Existen dos regiones bisagra bien definidas que permiten el movimiento de la "tapadera" y que se sitúan a cada lado: el tripéptido de Ser 82-84 y el tetrapéptido 92-95. Cuando la "tapadera" helicoidal se enrolla, para abrir el centro activo, su zona hidrofílica, que en la estructura nativa estaba expuesta al medio externo, queda parcialmente enterrada en una cavidad polar, previamente rellena con moléculas de agua bien ordenadas. Al mismo tiempo, el lado hidrofóbico de la tapadera queda completamente expuesto al medio externo, constituyendo una gran superficie apolar alrededor del centro activo (*ver II.2.4.; Figura 4*). De esta forma, la exposición de los residuos catalíticos al medio va acompañada por un marcado incremento en la hidrofobicidad de la superficie que le rodea. Así se explica la activación interfacial, por la estabilización de esta superficie apolar con la zona lipídica de la interfase, la cual podría crear una enzima catalíticamente activa, capaz de atacar la molécula de triglicérido, que se encuentra en la fase lipídica.

En la lipasa de *Rh.miehei* la activación enzimática se produce por el desplazamiento de la "tapadera", que deja al descubierto el centro catalítico⁵ y provoca un profundo cambio en la naturaleza de la superficie de la molécula de la lipasa activa con respecto a la superficie de la lipasa inactiva, ya que se crea una amplia superficie apolar, la cual estabiliza el contacto entre la enzima y la interfase lipídica. Al representar la diferencia de área superficial *versus* el número de los residuos (Figura 21) se observa que 12 aminoácidos de naturaleza hidrofóbica quedan especialmente expuestos en la superficie de la molécula; dichos aminoácidos son: Ile-85, Trp-88, Ile-89, Leu-92, Phe-94, Val-205, Leu-208, Phe-213, Val-254, Leu-255, Leu-258 y Leu-267⁶⁰.

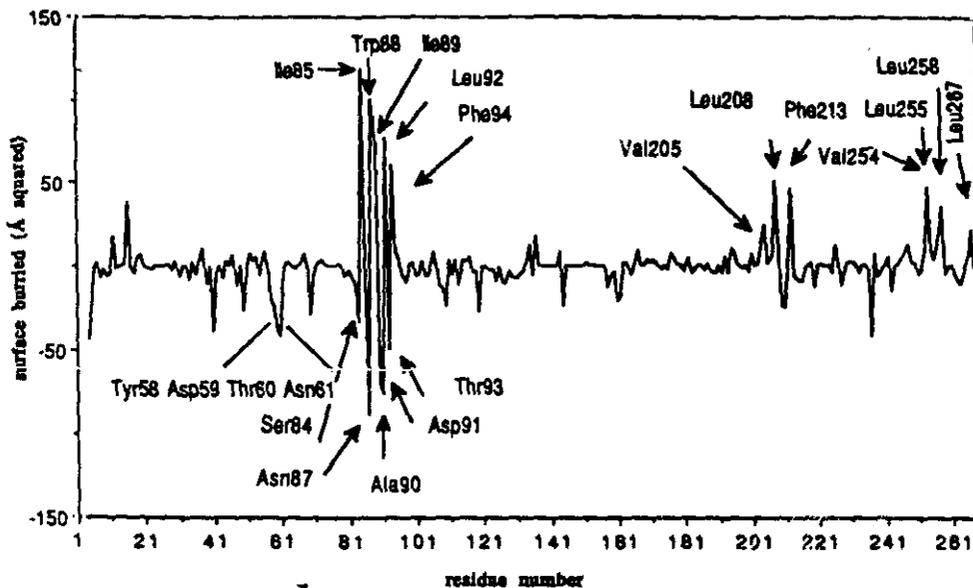


Figura 21: Representación de la diferencia de área superficial respecto al número de residuo⁶⁰.

El fragmento peptídico entre Arg-80 y Val-95 no está involucrado en ningún enlace de hidrógeno con otras zonas de la molécula; de esta forma, la "tapadera" interacciona con el cuerpo principal de la proteína solamente a través de interacciones hidrofóbicas¹⁷⁸.

Los estudios llevados a cabo por Derewenda y cols.⁶⁰ indicaron que, tras la activación, la lipasa de *Rh.miehei* se estabiliza por nuevos enlaces de hidrógeno formados entre la cadena lateral de Asn-87 (residuo de la "tapadera") y Tyr-60 con Asp-61, en la parte de la zona principal.

La enzima en un medio acuoso se estabiliza adoptando la forma inactiva cerrada, principalmente por efectos hidrofóbicos¹⁷⁹. Por el contrario, en un medio no polar, como una capa lipídica, la parte hidrofílica de la "tapadera" no podría formar interacciones polares favorables con el medio. Norin y cols.¹⁷⁶ sugieren, a través de un estudio teórico mediante dinámica y mecánica molecular, que la enzima se estabiliza en este medio abriendo su "tapadera" por medio de interacciones electrostáticas entre la "tapadera" y la cavidad polar de la enzima.

II.3.3.f.4.- Función de los residuos de Arginina en la estabilización de la tapadera abierta

Tras diversos estudios de la lipasa de *Rh.miehei* modificada químicamente en sus residuos de Arginina, se comprobó una variación en la actividad y enantioselectividad de esta lipasa. Esta modificación era especialmente significativa cuando el residuo alterado era la Arg-86. Modificaciones específicas de este residuo por mutaciones confirmaron la importante función de este aminoácido en la actividad enzimática. El residuo Arg-86 se localiza en la "tapadera" y participa en varios enlaces de estabilización de la conformación activa de la enzima. De todos estos datos se dedujo que la exacta posición de la "tapadera" tiene gran importancia en la actividad y especificidad de la enzima.

Norin y cols.¹⁷⁹ utilizaron técnicas de Mecánica Molecular para estudiar la apertura de la "tapadera" helicoidal de la lipasa de *Rh.miehei*, considerando los cálculos en vacío como un modelo simple del medio hidrofóbico. La "tapadera" se forzó a moverse reversiblemente, para poder analizar la forma nativa y la forma activa de la lipasa. La razón de por qué diferentes simulaciones de mecánica molecular conducen a estructuras abiertas o cerradas puede explicarse por las fuertes interacciones de la cadena lateral cargada de Arg-86 con Asp-203 (en la forma nativa o cerrada) o con Asp-91 (en la forma abierta o activa); en este último estado el residuo de Arg-86 se sitúa próximo a la superficie, mientras que el residuo Asp-91 queda enterrado en una cavidad polar.

Estudios más profundos del papel que desempeñan los residuos de Arginina en el proceso de activación de la lipasa de *Rh.miehei*, fueron llevados a cabo por Holmquist y cols.¹⁸⁸. Estos investigadores modificaron específicamente los residuos de arginina por reacción química con los inhibidores: 1,2-ciclohexanodiona y fenilglioxal. La enzima modificada presentaba una significativa pérdida de actividad (66 %), con tributirina como sustrato. A continuación, se analizó el grado de modificación de las argininas; Arg-86 fue el residuo que se modificó en mayor grado (85%); Arg-30, Arg-68 y Arg-160 se modificaron en menor grado (< 70 %) y Arg-7, Arg-80, Arg-178, Arg-196, Arg-197 y Arg-202 no se modificaron.

En la Figura 22 se muestra la disposición de los residuos de Arginina en la estructura general de la lipasa de *Rh.miehei*.

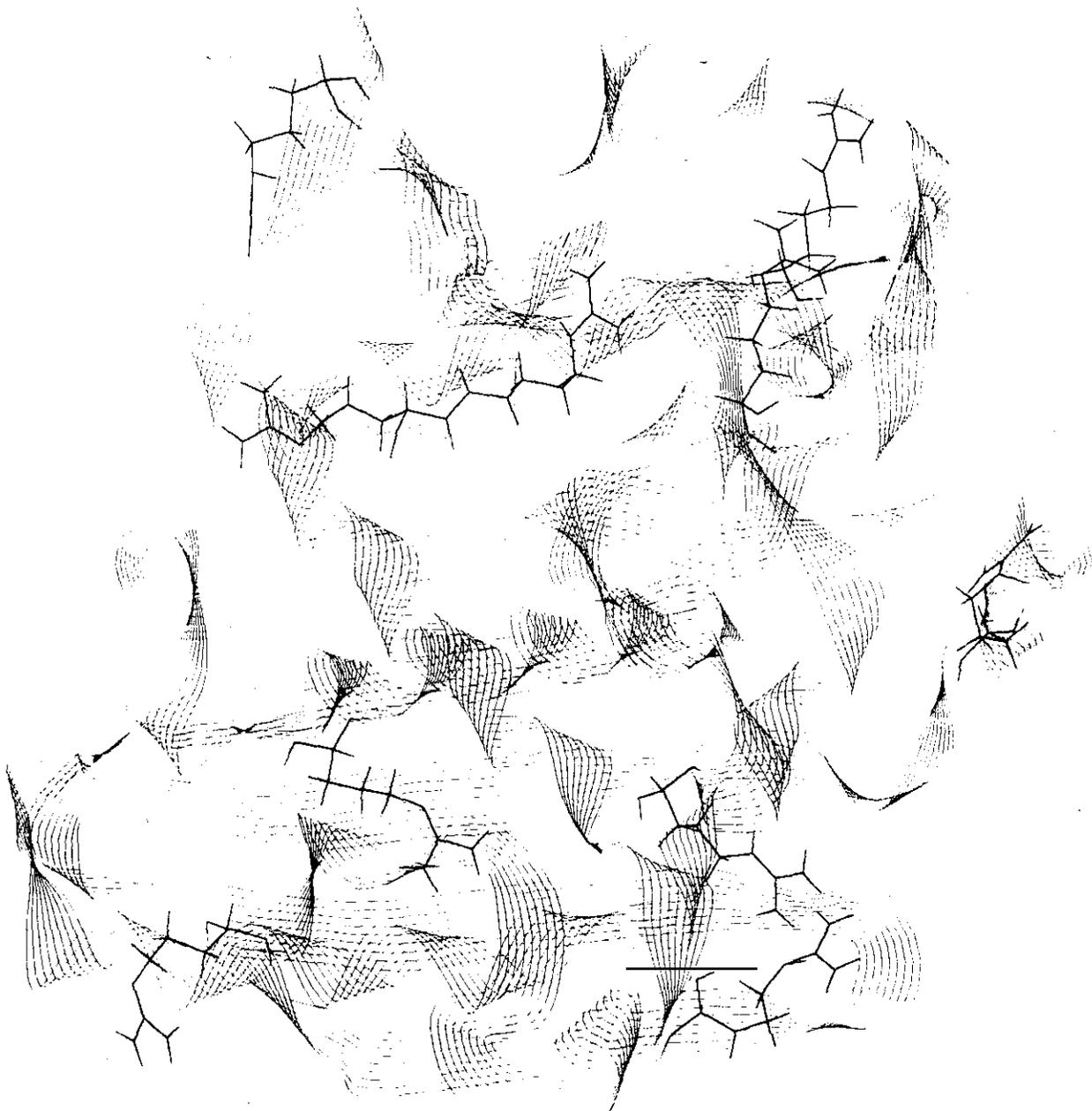


Figura 22: Localización de los residuos de **ARGININA** en la estructura de la lipasa de *Rh.miehei*.

A la vista de todos estos resultados, se mutó específicamente la **Arg-86** por guanidina y se observó una significativa disminución de la estabilidad del confórmero abierto. La guanidina es estructuralmente semejante a la cadena lateral de Arginina, por tanto podrá competir con Arg-86 en el lugar de enlace. De esta forma, la "tapadera" no podrá llegar a estar en su posición abierta adecuada, con lo que disminuirá la actividad enzimática y se alterará su enantioselectividad. Todos estos datos confirmaron la importante función que desempeña la Arg-86 en la inhibición de la lipasa de *Rh.miehei*.

Los residuos **Arg-30** y **Arg-80** están localizadas en una región de la lipasa, donde interacciona la zona polar de la "tapadera" con la superficie protéica en la conformación abierta. Por tanto, la modificación de estos dos residuos afectará a la conformación activa de la enzima.

Por su parte, los residuos **Arg-68** y **Arg-160** están más alejadas de la "tapadera" y del centro activo de la enzima; por tanto, su modificación apenas afectará a la actividad enzimática.

Además, las modificaciones de la Arg-86 pueden también alterar la enantioselectividad de esta lipasa. Este hecho fue analizado por Holmquist y cols.¹⁸⁹ en reacciones de hidrólisis ésteres alifáticos (2-metildecanoato de 1-heptilo) y de ésteres de alcoholes aromáticos o alifáticos (2-metildecanoato de fenilo) en ciclohexano. La lipasa de *Rh.miehei* nativa hidroliza preferentemente el enantiómero S ($E_s = 8,5$) del éster del alcohol alifático; por el contrario, con el éster del alcohol aromático es R-enantioselectiva ($E_R = 2,9$). La modificación química del residuo de Arg-86 altera la enantioselectividad de una reacción u otra en función del agente químico utilizado. Así, al modificar la enzima con 1,2-ciclohexanodiona se modifica la enantioselectividad de la reacción con el éster aromático ($E_R = 2,0$); por el contrario si la modificación química se realiza con fenilglioxal se altera la enantioselectividad para el éster alifático ($E_s = 2,5$).

Si la modificación enzimática se realiza por mutación de la Arginina por guanidina, disminuye la enantioselectividad de la reacción con el éster alifático ($E_s = 1,9$) y aumenta la enantioselectividad en la otra hidrólisis ($E_R = 4,4$) con el éster aromático. Todos estos resultados indican que la presencia de guanidina y el tratamiento con 1,2-ciclohexanodiona o con fenilglioxal originan diferentes conformaciones del centro activo de la lipasa de *Rh.miehei*.

La significativa alteración de la enantioselectividad de ambas reacciones, como resultado de la mutación con guanidina, sugiere que la cadena lateral polar de Arg-86 participa en la colocación adecuada de la "tapadera" en la conformación activa de la lipasa.

Por el contrario, en la reacción de síntesis del éster alifático en ciclohexano las modificaciones químicas o por mutación de la Arg-86 no alteran la enantioselectividad de la reacción.

A la vista de estos resultados se llegó a la conclusión de que en un medio orgánico la contribución de las interacciones electrostáticas para mantener la "tapadera" abierta son más importantes que la contribución de Arg-86; por esta razón, la modificación de dicho residuo no altera la correcta colocación de la "tapadera" ni la enantioselectividad de la enzima. Por el contrario, en agua, estas interacciones electrostáticas son mucho más débiles y la estabilidad de la conformación activa depende en mayor grado de las interacciones del residuo de Arg-86; por tanto, cualquier modificación en dicho residuo, altera la estabilidad de la "tapadera" abierta, y por tanto, la enantioselectividad de la lipasa de *Rh.miehei*.

II.3.3.g.- Moléculas de agua

En total se han identificado, dentro de la estructura cristalizada de la lipasa de *Rh.miehei*, 230 moléculas de agua, de las cuales 12 tiene un inequívoco carácter interno¹⁷⁸.

197 moléculas (86 %) están unidas directamente con la proteína por enlaces de hidrógeno: 14 de ellas forman 4 enlaces de hidrógeno con átomos de la proteína (su factor de temperatura isotrópica media (B) es $24,5 \text{ \AA}^2$, lo cual refleja, como era de esperar, su reducida movilidad). Un total de 27 moléculas de agua forman 3 enlaces de hidrógeno (B medio= $29,8 \text{ \AA}^2$), 52 moléculas forman 2 enlaces de hidrógeno (B medio= $37,3 \text{ \AA}^2$) y 104 moléculas forman un sólo enlace de hidrógeno con la proteína (B medio= $45,6 \text{ \AA}^2$).

De las restantes 33 moléculas de agua; 30 están unidas a otras moléculas de agua y las otras 3 no están unidas a ningún átomo. Todas estas moléculas se han caracterizado por técnicas de densidad electrónica difusa y factores de alta temperatura.

La gran mayoría de los agrupamientos de moléculas de agua se colocan alrededor de los residuos polares y/o cargados de la superficie formando una intrincada red de enlaces de hidrógeno que interconecta los aminoácidos y sus agrupamientos.

Una gran proporción de moléculas de agua están asociadas a agrupamientos polares.

En la Tabla 7 aparece un listado de las moléculas de agua y sus enlaces e interacciones con los distintos aminoácidos. Esta distribución es característica de proteínas globulares.

Tabla 7: Moléculas internas de agua: enlaces de hidrógeno, enlaces por fuerzas de Van der Waals y asignación de los átomos de hidrógeno.

Wat55	O:	←	N ^{α2}	Arg197	3.0 Å
	O:	←	N ^{α1}	Arg197	3.1 Å
	O-H	→	:O	Wat56	2.6 Å
	O	VdW	O ^{β1}	Glu121	
Wat56	O:	←	H-O	Wat55	2.6 Å
	O-H1	→	:O	Pro206	2.8 Å
	O-H2	→	:O ^{β1}	Asn246	2.7 Å
	O	VdW	N ^{α2}	Asn207	3.1 Å
	O	VdW	N ^{α2}	Arg178	3.2 Å
Wat57	O-H1	→	:O	Asp203	2.8 Å
	O-H2	→	:O	Glu201	2.9 Å
	O:	←	N ^{α2}	His207	2.7 Å
	O	VdW	C	Arg202	3.3 Å
	O	VdW	C ^β	Ser245	3.3 Å
Wat189	O-H1	→	:O	Thr173	3.1 Å
	O-H2	→	:O	Thr198	2.8 Å
	O:	←	N	Gln176	3.1 Å
	O:	←	H-O	Wat190	3.0 Å
	O	VdW	O	Thr173	3.4 Å
	O	VdW	C	Thr173	3.4 Å
	O	VdW	C ^γ	Arg197	3.4 Å
	O	VdW	N	Gly175	3.2 Å
	O-H1	→	:O	Wat189	3.0 Å
	O-H2	→	:O	Gln176	2.9 Å
Wat190	O:	←	N ^{α1}	Arg196	2.7 Å
	O	VdW	C ^β	Pro206	3.4 Å
	O	VdW	C ^γ	Arg197	3.4 Å
	O	VdW	N	Gly175	3.2 Å
	O-H1	→	:O ^α	Tyr195	3.0 Å
	O-H2	→	:O	Tyr195	3.3 Å
Wat48	O:	←	N ^{α1}	His217	2.8 Å
	O:	←	N ^{α2}	Gln176	3.0 Å
	O:	←	H-O	Wat47	3.0 Å
	O	VdW	N	Ala218	3.3 Å
	O-H1	→	:O	Wat48	3.0 Å
	O-H2	→	:O	Leu216	2.7 Å
	O:	←	N	Val179	3.0 Å
Wat5	O-H1	→	:O	Leu17	3.0 Å
	O-H2	→	:O	Wat6	2.7 Å
	O:	←	N ^{α2}	Gln174	2.9 Å
Wat6	O	VdW	O ^γ	Thr21	3.5 Å
	O-H1	→	:O	Thr173	3.0 Å
	O-H2	→	:O	Arg196	2.6 Å
	O:	←	H2-O	Wat5	2.7 Å
	O	VdW	:O ^{γ1}	Thr198	2.6 Å
Wat91	O-H	→	:O	Phe79	2.7 Å
	O:	←	N	His143	2.9 Å
	O	VdW	C ^β	His143	3.5 Å
	O	VdW	C ^β	Ser24	3.3 Å
Wat264	O-H	→	:O	Leu23	2.7 Å
	O-H	→	S	Met165	3.6 Å
	O	VdW	O	Ser27	3.4 Å
	O	VdW	O ^β	Asn26	3.4 Å
	O-H	→	:O ^{γ1}	Ser44	2.7 Å
Wat27	O:	←	N	Ser82	3.0 Å
	O:	←	N	Ser145	3.3 Å
	O	VdW	C ^β	Ser82	3.2 Å
	O	VdW	C ^β	Leu145	3.4 Å
	O	VdW	C ^β	Ser144	3.5 Å
	O	VdW	C ^{α2}	Trp88	3.4 Å
	O	VdW	C ^{α3}	Trp88	3.3 Å

En la lipasa de *Rh.miehei*, además de estas características típicas, aparecen moléculas de agua encerradas en el interior de la proteína, formando una profunda depresión llena de moléculas de agua, adyacente al centro activo. Esta depresión constituye un espacio alternativo para la "tapadera", durante la activación enzimática pues puede interactuar con ellos o con el microentorno hidrófilo que rodea a la proteína.

II.3.3.g.1.- Localización de las moléculas internas de agua y su implicación en el proceso de plegamiento molecular

Muchas proteínas contienen moléculas de agua internas, unidas fuertemente a cadenas laterales polares o a la cadena principal. Estas moléculas suelen quedar atrapadas en el interior durante el proceso de plegamiento de la cadena proteica y se convierten en parte de la arquitectura molecular de la proteína. Estudios de resonancia magnética nuclear de alta resolución indican que estas moléculas están en idéntica situación en la estructura cristalizada y en disolución, lo que indica que no se intercambian con el medio.

La lipasa de *Rh.miehei* no es una excepción y contiene una serie de moléculas de agua estrictamente internas, ocultas bajo los bucles de la cadena principal. El agrupamiento más grande (formado por 7 moléculas de agua) se sitúa en el lado proximal de la zona central de láminas β , justo debajo del segmento C-terminal de la hebra 8, del siguiente giro y del oligopéptido C-terminal (del residuo 231 en adelante). Las moléculas de agua están agrupadas en tres grupos de dos moléculas cada uno y un grupo de una sola molécula.

Las moléculas de agua, denominadas **W5** y **W6** constituyen un agrupamiento que se sitúa en el centro de la interfase formada por el lado distal de la lámina β y la hélice N-terminal.

El agua **W91**, situada al final del fragmento C-terminal de la misma hélice, también forma parte de la interfase.

El agua **W264** está enterrada bajo el largo bucle que hay entre la hélice N-terminal y la primera hebra de la lámina β (residuos del 27 al 49). Esta molécula está estabilizada por un poco común puente de hidrógeno con el átomo de azufre del residuo Met-65.

Cualquier cambio en alguna de estas moléculas de agua requeriría un desplegamiento parcial de la proteína. En algún caso, sería necesario un "ablandamiento" del segmento C-terminal, en otros casos, se tendría que producir una disociación temporal del extremo N-

terminal de la hélice α con la lámina β .

Algunas evidencias experimentales apuntan hacia la teoría de la existencia de intermedios de plegamiento, en los cuales se forman algunos elementos de estructura secundaria, previos al plegamiento final de la estructura terciaria de la proteína. La distribución de las moléculas internas de agua, junto con la localización de los residuos de prolina y los puentes bisulfuro, parece sugerir que las hebras 1-6, junto con los bucles de interconexión podrían plegarse primero con el extremo C-terminal; seguido de una fase lenta durante la cual la hélice N-terminal queda anclada sobre la hoja completa, permitiendo a los residuos del 5 al 8 unirse de forma antiparalela a la hebra 8.

Por otro lado hay que destacar la localización de la molécula de agua **W27**, que ocupa el lugar de unión del sustrato, o más precisamente, el agujero oxianiónico. Esta molécula dona un protón al oxígeno del grupo hidroxilo de la Serina activa y acepta dos enlaces de hidrógeno de los grupos amida de Ser-82 y Leu-145 de la cadena principal.

II.3.3.g.2.- Depresión hidrofílica adyacente a la tapadera.

Con frecuencia, en la superficie de las proteínas globulares aparecen pequeñas depresiones ocupadas por moléculas ordenadas de disolvente. En el caso de la lipasa de *Rh.miehei*, esta característica tiene una gran importancia, ya que esta depresión superficial parece ser la posición alternativa de la "tapadera" durante la activación de la lipasa o apertura del centro activo por desplazamiento de dicha tapadera¹⁷⁸.

3 fragmentos de la cadena polipeptídica rodean esta depresión de 13 Å de profundidad: el fragmento entre los residuos 59 y 61 (parte de la conexión entre las hebras 1 y 2); el final de la zona N-terminal de la hélice 3 (residuos del 108 al 113) y la zona polar de la "tapadera. Uno de los puentes salinos superficiales (Asp61-Arg80) se sitúa en la periferia de esta cavidad. El fondo de la hendidura está ocupada por residuos polares: Thr-149 (en el punto más profundo), Thr-62, Ser-114, Ser-82 y His-108. Además hay 12 moléculas de agua unidas directamente a los átomos de la proteína y 13 moléculas unidas a la capa secundaria.

II.3.3.h.- Localización de los residuos de Lisina.

Uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral fue la inmovilización de la lipasa de *Rh.miehei* por enlace covalente con un soporte de sílice, punto que será tratado en profundidad en las secciones siguientes de esta Memoria. Sin embargo, dentro del estudio de la estructura de la lipasa de *Rh.miehei* es importante analizar la localización de los residuos de lisina, ya que el enlace covalente entre la enzima y el soporte se realiza a través del grupo amino de estos residuos.

La lipasa de *Rh.miehei* presenta 7 residuos de lisina (Lys-50, 53, 73, 106, 109, 131 y 137) y como se observa en la Figura 23, todas ellas se sitúan muy expuestas al medio. Además, se encuentran suficientemente separadas del centro activo y de la tapadera, como para no interferir en los cambios estructurales de la proteína durante el proceso de activación enzimática y no obstaculizar el acceso de los sustratos hasta el centro activo. Por tanto, se puede considerar viable la inmovilización de la lipasa de *Rh.miehei* a través de los residuos de lisina.

II.3.3.i.- Relación entre el mecanismo de acción y la estructura de la lipasa de *Rh.miehei*

Tras el análisis estructural de la lipasa de *Rh. miehei*⁵⁸ se llegó a la conclusión de que el mecanismo de acción de la lipasa se desarrolla en dos fases. Primero, se desplaza la "tapadera", posiblemente a través de una activación interfacial; y a continuación, el enlace éster se hidroliza por medio de un mecanismo muy similar al de las serín proteasas.

El desplazamiento de la "tapadera", en respuesta a la adsorción de la lipasa a la interfase aceite-agua, es considerado como la base estructural para el proceso de activación interfacial.

Las consecuencias funcionales de los cambios estructurales de las lipasas son los siguientes⁴⁶:

a).- la accesibilidad del sustrato hasta el centro activo de la enzima es mayor, ya que éste, antes del cambio estructural estaba enterrado.

b) .- se crea una extensa superficie hidrófoba alrededor del acceso al centro activo.



Figura 23: Localización de los residuos de LISINA en la lipasa de *Rh.miehei*.

II.4.- INMOVILIZACION DE ENZIMAS

II.4.1.- DEFINICIÓN

La inmovilización de enzimas fue definida en la 1ª Conferencia sobre Ingeniería Enzimática¹⁹⁰ como el proceso por el cual se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y permiten ser reutilizadas repetidamente.

Esta definición fue posteriormente ampliada indicando que la inmovilización es el proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte¹⁹¹.

II.4.2.- VENTAJAS DE LA INMOVILIZACIÓN

La inmovilización de enzimas presenta una serie de ventajas entre las que destaca el aumento de la estabilidad del biocatalizador. Además se pueden citar una serie de ventajas desde el punto de vista bioquímico e industrial.

II.4.2.a.- Aumento de la estabilidad enzimática.

El incremento de la estabilidad de las enzimas observado tras el proceso de inmovilización se debe fundamentalmente a:

a).- La restricción de los cambios conformacionales de la enzima, por la existencia de uniones multipuntuales enzima-soporte¹⁹². Estas uniones confieren mayor rigidez a la enzima. De esta forma, la enzima se hace más resistente a las desactivaciones térmica y química, las cuales implican un cambio conformacional del sistema.

b).- Alteración del microentorno de la enzima.

Esta alteración es consecuencia de las interacciones enzima-soporte¹⁹². La presencia de un mínimo porcentaje de agua favorece¹⁹³ la estabilidad del derivado enzimático, la transferencia de masa de los sustratos hidrófobos hacia el centro activo y los procesos de síntesis, respecto de los de hidrólisis. Esta mínima cantidad de agua, localizada en el microentorno del centro activo, viene regulada, en las enzimas inmovilizadas, por un parámetro denominado acuofilia del soporte, tal y como se comentó en la sección II.2.6.c.3.

Cuanto mayor es la *acuofilia* de un soporte, más agua absorberá este, retirándola por

tanto del centro activo de la enzima en aquellos medios con baja concentración de agua, lo cual hace que no se pueda adquirir la conformación activa, disminuyendo así la eficacia del biocatalizador. Así pues hay que considerar que el soporte no es del todo inerte, sino que juega un papel muy importante en la actividad de la enzima inmovilizada.

II.4.2.b.- Ventajas desde el punto de vista industrial

La utilización de enzimas inmovilizadas a nivel industrial presenta una serie de ventajas añadidas:

- a).- Disminución de los costes del proceso industrial, ya que es posible la reutilización del catalizador enzimático.

- b).- Aumento del control del proceso, por lo que se puede optimizar el rendimiento de producto final y su calidad, debido a que la enzima se separa fácilmente del producto.

- c).- Posibilidad de realizar procesos continuos y/o multienzimáticos, que son fácilmente automatizables y requieren menos mano de obra que los procesos discontinuos.

II.4.2.c.- Ventajas desde el punto de vista bioquímico.

Con la aparición de los derivados inmovilizados se han podido solventar una serie de inconvenientes y aclarar algunas propiedades que presentan los sistemas protéicos *in vivo*, y que difícilmente podrían ser simulados en soluciones homogéneas¹⁹⁴.

- a).- Se pueden prevenir las interacciones proteína-proteína que conducen a agregaciones o a autólisis, lo cual a menudo produce efectos indeseables¹⁹⁵⁻¹⁹⁷, ya que al fijar una proteína a un soporte, se impiden los movimientos translocacionales y rotacionales, incluso si está atrapada en un gel¹⁹⁸. Esto es factible siempre y cuando el soporte no esté completamente recubierto de moléculas de enzima¹⁹⁹.

- b).- Se evitan posibles cambios conformacionales, que podrían provocar la alteración, o incluso desaparición, de algunas funciones biológicas de la enzima. Este hecho

resulta de gran utilidad para el estudio de las relaciones estructura-actividad de las proteínas²⁰⁰.

c).- En el caso de tener moléculas de diferente naturaleza (hidrofóbicas, con carga, etc) co-inmovilizadas con la enzima, el microentorno puede ser manipulado para simular situaciones que se producen *in vivo*. Esto también puede conseguirse variando la naturaleza del soporte²⁰¹.

d).- Se pueden crear sistemas estructuralmente asimétricos²⁰², en los cuales la concentración de las moléculas de enzima no sea uniforme en todo el volumen, lo cual puede simular los modelos cinéticos de sistemas de membranas.

II.4.3.- INCONVENIENTES DE LA INMOVILIZACION

A pesar de todas estas ventajas la inmovilización de enzimas presenta una serie de inconvenientes²⁰³:

a).- Se produce la alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo.

b).- El sistema enzima-soporte es heterogéneo, ya que pueden existir diferentes fracciones de proteína inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte.

c).- Es posible que la enzima pierda total o parcialmente su actividad durante el proceso de inmovilización.

d).- Inicialmente aumenta el coste del proceso porque hay que añadir el procedimiento de inmovilización.

II.4.4.- METODOS DE INMOVILIZACION

Aunque existen numerosos métodos de inmovilización, cada uno de los cuales presenta un diferente grado de complejidad y eficacia, ninguno de ellos reúne todas las ventajas de la inmovilización. Por esta razón es interesante analizar los métodos disponibles y compararlos, ya que la actividad, estabilidad y facilidad de manejo del biocatalizador puede variar enormemente según el método empleado.

Las lipasas han sido inmovilizadas siguiendo numerosos métodos, pero presentan la dificultad adicional de su bajo nivel de pureza y la presencia de moléculas de hidratos de carbono en su estructura, cuyos grupos hidroxilo pueden competir con los grupos amino de los residuos de lisina de la proteína para unirse al soporte, cuando se pretende llevar a cabo la inmovilización por dichos residuos.

II.4.4.a.- Clasificación de los métodos de inmovilización

Los métodos de inmovilización se pueden clasificar en dos grandes categorías¹⁹²:

A) Métodos físicos :

La enzima no sufre modificaciones estructurales ya que queda retenida físicamente por la estructura del soporte.

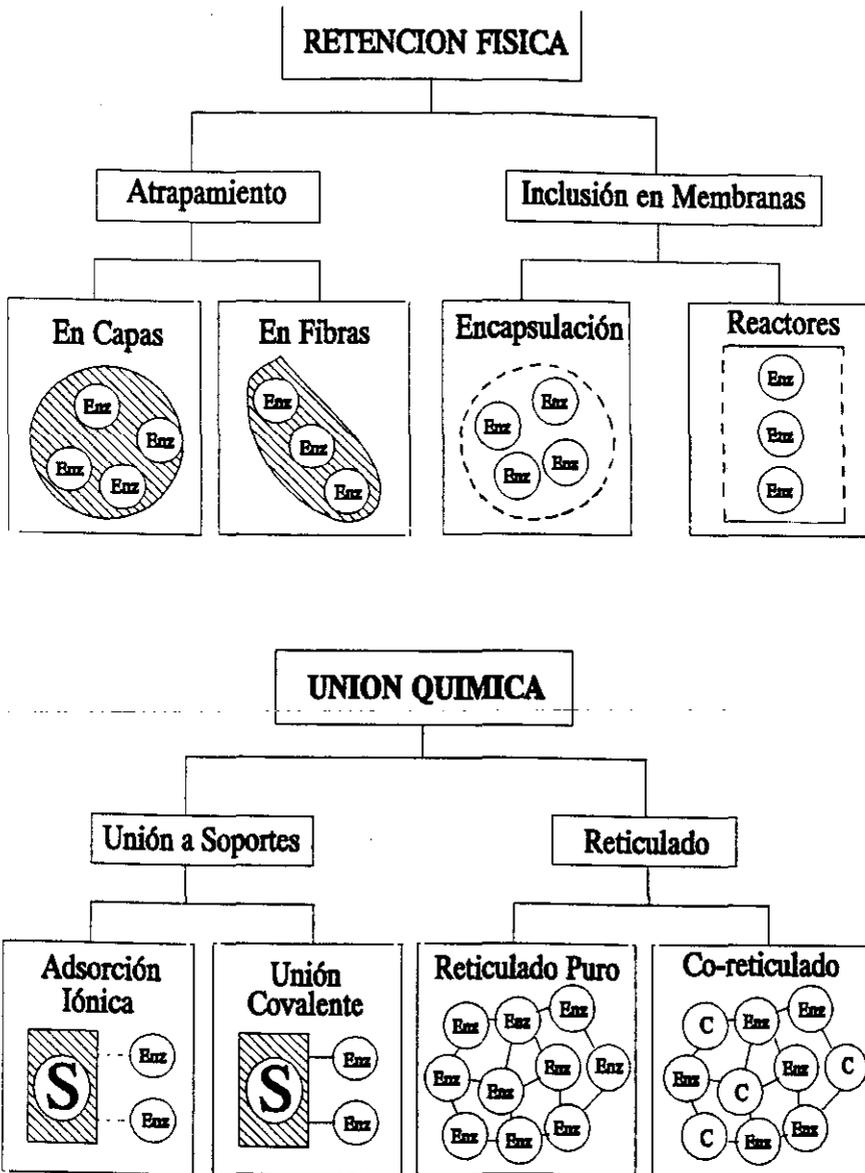
- * Atrapamiento en una matriz.
- * Inclusión en membranas:
 - microencapsulación
 - reactores de membrana

B) Métodos químicos:

La enzima se une al soporte por una unión química.

- * Entrecruzamiento.
- * Unión a soportes:
 - adsorción iónica
 - unión covalente

En el Esquema 18 se representan los diferentes métodos de inmovilización enzimática



Esquema 18: Principales métodos de inmovilización de enzimas.

II.4.4.b.- Tipo de soportes

Una gran variedad de materiales naturales o sintéticos, orgánicos e inorgánicos se han empleado como soportes para inmovilizar enzimas. Estos materiales difieren entre sí por su tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente suelen ser cilindros, hojas, fibras y más frecuentemente esferas.

La elección del tipo de soporte depende fundamentalmente de la aplicación industrial posterior de la enzima inmovilizada. Algunas de las características que se tienen en consideración acerca de la naturaleza del soporte son²⁰⁴:

- Resistencia mecánica.
- Resistencia a la contaminación microbiana.
- Funcionalización química.
- Facilidad de regeneración.
- Estabilidad térmica.
- Estabilidad frente agentes químicos.
- Caracter hidrofílico/hidrofóbico.
- Capacidad de carga de enzima.
- Coste del soporte.

Sin embargo, ninguna sustancia presenta todas estas propiedades juntas y en un grado adecuado; por esta razón, se han empleado una gran variedad de soportes, los cuales pueden clasificarse en dos grandes grupos, en función de su naturaleza: soportes orgánicos (proteínas fibrosas como colágeno y queratina; polímeros sintéticos como acrilamida, alcohol polivinílico, hidrogeles, resinas fenólicas, etc.) y soportes inorgánicos (silice, bolas de vidrio, alúmina, óxidos de titanio, etc.)

II.4.4.c.- Factores a considerar en el proceso de inmovilización.

Debido a que no existe un método "perfecto" de inmovilización se deben analizar una serie de factores del biocatalizador para determinar si la estrategia seguida es adecuada²⁰⁵.

Dichos factores son los siguientes:

- Actividad enzimática.
- Efectividad de la utilización de la enzima.
- Desactivación y características de regeneración.
- Coste del proceso de inmovilización.
- Toxicidad de los agentes empleados en el proceso de inmovilización.
- Propiedades finales deseadas en el derivado inmovilizado.
- Reacción a la que se aplicará el derivado inmovilizado.

II.4.4.d.- Comparación de los diferentes métodos de inmovilización

En la Tabla 8 se resumen y comparan las características generales de los diversos métodos de inmovilización.

Tabla 8: Comparación de los diferentes métodos de inmovilización

METODO	Inclusión en membranas	Atrapa- miento	Entrecru- zamiento	Adsorción química	Unión covalente
Preparación	Media	Difícil	Media	Sencilla	Difícil
Fuerza de unión	Débil	Media	Media-débil	Media	Fuerte
Actividad enzimática	Media-alta	Baja	Baja	Media	Alta
Regeneración soporte	Posible	Imposible	Imposible	Posible	Difícil
Coste proceso	Medio-alto	Medio	Medio	Bajo	Alto
Estabilidad	Media	Alta	Alta	Baja	Media-alta
Validez	General	General	Limitada	General	Limitada
Protección frente ataques microbianos	Si	Si	Si	No	No

A continuación, se analizarán en profundidad los métodos químicos de inmovilización (adsorción iónica y unión covalente) ya que en la presente Tesis Doctoral se inmovilizó la lipasa de *Rh.miehei* por unión covalente sobre sílice y se estudió el derivado comercial de esta lipasa (Lipozyme® IM20), inmovilizada por adsorción sobre una resina de intercambio aniónico.

II.4.5.- INMOVILIZACION POR ADSORCIÓN IÓNICA

Este ha sido el método más utilizado para inmovilizar lipasas. Este método se basa en la unión de la enzima a un soporte sin funcionalizar por medio de puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones iónicas.

El proceso de adsorción se realiza en dos fases: en la primera se produce la difusión de la enzima hacia el soporte y en la segunda se une la enzima a los centros capacitados de la superficie del soporte. Estas dos fases están controladas por la carga externa de la proteína y del soporte, siendo el paso de unión mucho más rápido que el paso de difusión²⁰⁷⁻²⁰⁹.

Mediante esta metodología se han inmovilizado sobre Celite la lipasa de *Aspergillus niger*²¹⁰, *Rhizomucor miehei*²¹¹, la lipasa de *Geotrichum candidum*²¹² sobre alumina y la lipasa de páncreas porcino²¹³ sobre vidrio poroso.

Una variante de la inmovilización por adsorción consiste en emplear resinas de intercambio iónico, que contienen grupos funcionales y contraiones móviles. Estos contraiones pueden ser intercambiados reversiblemente por otros iones que presenten la misma carga sin que se produzcan cambios en la matriz insoluble. Siguiendo este procedimiento se han inmovilizado la lipasa de *C.rugosa* sobre Duolite y Amberlite²¹⁴ y la lipasa de *Rh.miehei* en Duolite²¹⁵ y otras resinas macroporosas^{216,217}.

En la presente Tesis Doctoral se ha empleado la lipasa de *Rh.miehei* inmovilizada sobre Duolite y comercializada por el laboratorio Novo-Nordisk con la denominación de Lipozyme® IM20. Las características técnicas de este derivado inmovilizado se recogen en la sección Experimental.

II.4.6.- INMOVILIZACION POR UNION COVALENTE

Esta metodología se basa en la activación previa de determinados grupos químicos del soporte para que reaccionen con grupos nucleófilos de la proteína. Los grupos funcionales de las proteínas implicados con mayor frecuencia en la unión con el soporte son los grupos ε-amino de los residuos de lisina y los grupos carboxilato de los residuos aspartato y glutamato, todos ellos situados hacia el exterior de la superficie protéica. Dado que en la presente Tesis Doctoral se siguió esta metodología para inmovilizar la lipasa de *Rh.miehei* se analizó la localización de los residuos de lisina en el esqueleto protéico (ver II.3.3.h.)

El proceso de activación del soporte se lleva a cabo en condiciones drásticas, incompatibles con la estabilidad de la enzima, por lo que este método requiere dos pasos: activación previa del soporte y posterior inmovilización de la enzima, que debe realizarse inmediatamente, ya que las formas activadas de los soportes suelen ser muy inestables.

II.4.6.a.- Funcionalización del soporte

La funcionalización del soporte se puede llevar a cabo siguiendo diversos métodos. La elección de la metodología a seguir está en función del tipo de soporte y la naturaleza de la enzima que se vaya a inmovilizar a continuación. Los métodos de funcionalización más empleados en la inmovilización de lipasas son los siguientes:

- * *vía aminosilano.*
- * *vía bromocianógeno*
- * *vía carbodiimida*
- * *vía glicidol*
- * *vía 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (TCT)*

Este es el método seguido para activar el soporte (sílice) sobre el que se inmovilizó la lipasa de *Rh.miehei* en la presente Tesis Doctoral.

Este método permite la activación de polisacáridos en general utilizando 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina y fue descrito originariamente por Kay y Crook²¹⁸. En este proceso de activación el soporte puede reaccionar mediante uno o dos grupos con el agente activante (generalmente cuanto mayor es el tiempo de reacción más moléculas de TCT reaccionan con los grupos del soporte), obteniéndose de este modo una activación completamente irreversible. Siguiendo este método se ha inmovilizado también la lipasa de *C.cylindracea*²¹⁹.

II.5.- ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINEs)

II.5.1.- PATOLOGIA DE LA INFLAMACION

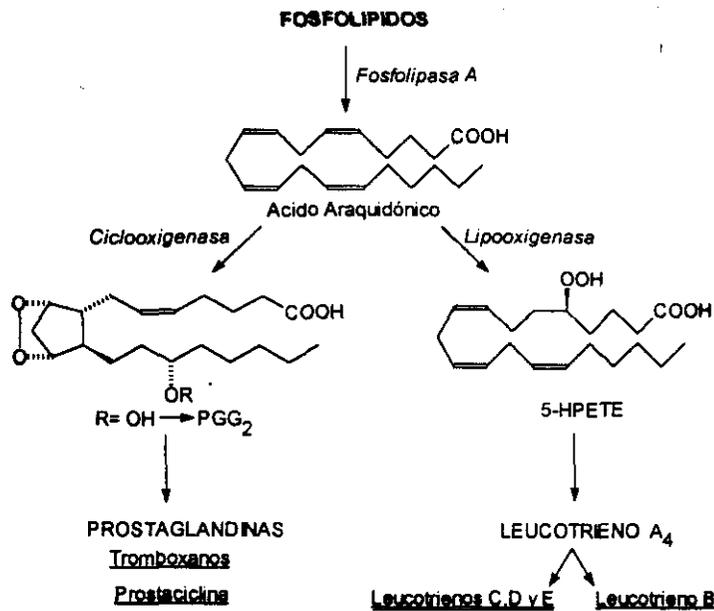
La patología producida por la inflamación tiene una gran incidencia a nivel mundial debido a su implicación en numerosas enfermedades como: la artritis reumatoide, la dismenorrea, la osteoartritis y otros procesos reumáticos agudos y/o crónicos, lo cual ha potenciado el estudio de fármacos eficaces para mitigar el proceso de la inflamación.

La inflamación es un mecanismo de defensa del organismo frente a lesiones tisulares causadas por traumatismos, productos químicos, etc. durante la cual se liberan gran cantidad de sustancias que provocan una serie de procesos de defensa en el organismo²²⁰:

- a).- vasodilatación local con aumento del flujo sanguíneo en la zona.
- b).- aumento de la permeabilidad de los capilares, con lo que se produce la fuga de grandes cantidades de líquido hacia los espacios intersticiales
- c).- coagulación de líquido en estos espacios debido al exceso de fibrinógeno y otras proteínas que salen de los capilares.
- d).- tumefacción celular.
- e).- infiltración celular y fagocitosis.
- f).- proliferación de fibroblastos y síntesis de tejido conjuntivo que actúan reparando la lesión que se ha producido.

Las sustancias liberadas durante el proceso inflamatorio se clasifican en dos grupos: histamina y eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos).

Los eicosanoides constituyen un conjunto de sustancias procedentes de ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos, en especial del ácido araquidónico que es el precursor más importante de los mediadores celulares que intervienen en el proceso inflamatorio. En el Esquema 19 aparece el proceso de transformación del ácido araquidónico en prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos por acción de la ciclooxigenasa y en leucotrienos por acción de la lipooxigenasa.



Esquema 19: Cascada del ácido araquidónico.

II.5.2.- FARMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINEs)

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son un conjunto de fármacos analgésicos que poseen actividad antitérmica y antiinflamatoria. Se denominan no esteroideos para diferenciarlos de los corticoides con actividad antiinflamatoria.

La eficacia relativa de cada uno puede ser diferente para cada acción; de ahí que su utilización en una determinada indicación terapéutica dependerá de su grado de eficacia y de su grado de toxicidad.

Todos los AINEs actúan sobre el proceso inflamatorio inhibiendo la síntesis de prostaglandinas mediante la inhibición de la enzima ciclooxygenasa (esquema 19), aunque el grado de actividad antiinflamatoria varía de unos AINEs a otros. Sin embargo, no hay estudios que relacionen el grado de inhibición de la ciclooxygenasa con la eficacia antiinflamatoria en pacientes individuales^{221,222}

II.5.2.a.- Evolución histórica

La primera terapia utilizada para el tratamiento de la artritis reumatoide se basaba en el empleo de corticoesteroides. No obstante, debido al carácter crónico de esta enfermedad,

el tratamiento prolongado con estos fármacos produjo la aparición de numerosos e importantes efectos secundarios. Por esta razón, durante los años cincuenta el departamento de investigación de la compañía Boots Pharmaceutical comenzó a trabajar en la búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios no esteroidicos (AINEs). Se comenzó buscando nuevas hipótesis que explicasen la actividad antiinflamatoria de la aspirina y otros compuestos como los pirazoles²²³ con el objeto de encontrar agentes más potentes y con menos efectos secundarios que éstos.

Tras una serie de estudios sobre la aspirina y sus análogos estructurales se llegó a la conclusión de que el grupo funcional fundamental era el ácido carboxílico. En 1957 se descubrió que algunos ácidos alcanóicos y alquenóicos, derivados del bifenilo, estilbena y difeniletano, presentaban propiedades antirreumáticas, pero los resultados de las pruebas biológicas (ensayos "in vivo") no fueron satisfactorias²²⁴.

Sin embargo, los ácidos fenil-alcanóicos, y en particular, los *para*-sustituidos con radicales alquílicos, se mostraron terapéuticamente válidos. Entre todos ellos destacó el ácido 4-isobutilfenilacético (Ibuprofeno) que presentaba una actividad antiinflamatoria de dos a cuatro veces superior a la aspirina y era mucho mejor tolerado que ésta.

El aumento de longitud de la cadena alquílica condujo la obtención de una serie de ácidos más activos, los ácidos propiónicos sustituidos en posición 2 con un grupo arilo. De todos ellos el que presentaba mayor actividad era el ácido 2-(4'-isobutil)fenilpropiónico (comercializado con el nombre de Ibuprofeno) que presenta actividad farmacológica entre 16 y 32 veces más potente que la aspirina y con menores efectos secundarios.

II.5.2.b.- Clasificación

Los AINEs se clasifican en seis familias en función de su estructura química. En la Tabla 9 aparecen estos grupos y el fármaco prototipo de cada uno de ellos.

Tabla 9: Clasificación de fármacos antiinflamatorios no esteroídicos (AINEs).

Grupo farmacológico	Fármaco prototipo
ácido salicílico	ácido acetilsalicílico (AAS)
<i>para</i> -aminofenol	Paracetamol
pirazolona	Metamizol
ácido propiónico	Naproxeno
ácido indolacético	Indometacina
ácido pirrolacético	Ketorolaco
ácido fenilacético	Diclofenaco
ácido piranoacético	Etodolaco
ácido antranílico	ácido mefenámico
ácido nicotínico	Isonixina
oxicams	Piroxicam

II.5.2.c.- Mecanismo de acción

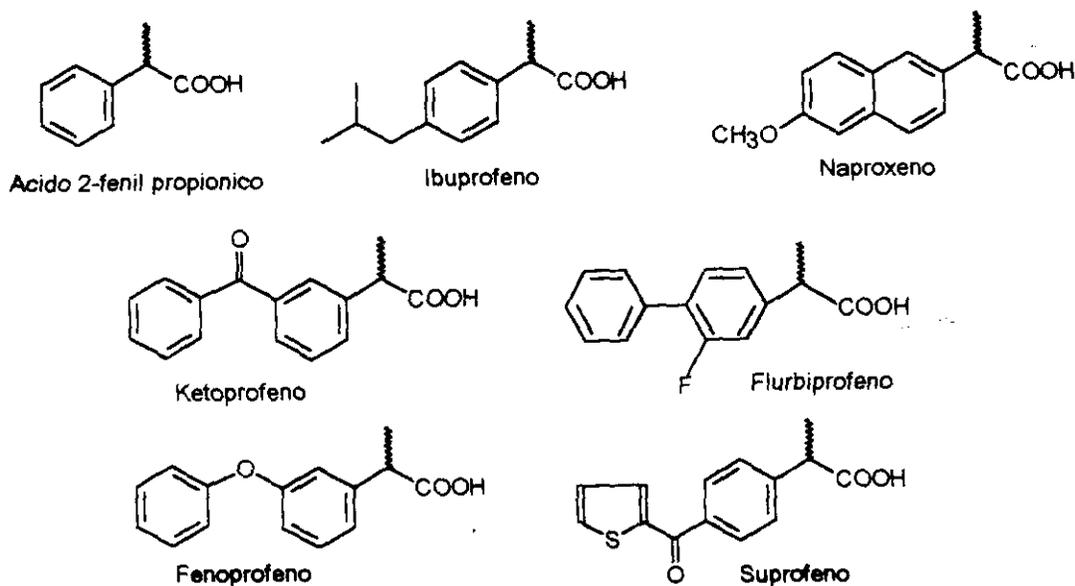
El mecanismo de acción de los AINEs se basa en la inhibición de la ciclooxigenasa, enzima que convierte el ácido araquidónico en un endoperóxido cíclico, el cual se transforma en prostaglandinas y tromboxanos (Esquema 19). La inhibición de la acción de la ciclooxigenasa consiste en que los AINEs impiden la sustracción del hidrógeno de C-13 del ácido araquidónico y, por tanto, bloquean la peroxidación en C-11 y C-15. El mecanismo difiere de unos AINEs a otros, pero en todos los casos la inhibición es estereoespecífica.

II.5.3.- AINEs DERIVADOS DEL ACIDO (R,S) 2-ARILPROPIÓNICO

Uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral es la obtención de AINEs pertenecientes al grupo de fármacos con estructura de ácido 2-arilpropiónico con elevada pureza óptica, utilizando como catalizador del proceso la lipasa de *Rhizomucor miehei*.

Estos fármacos constituyen un grupo homogéneo, dentro de los AINEs, por sus

características químicas y farmacológicas; aunque varían sus características farmacocinéticas. En el esquema 20 se muestran algunos de los AINEs pertenecientes a este grupo.



Esquema 20.- AINEs derivados del ácido 2-arilpropiónico

II.5.3.a.- Acciones farmacológicas

Todos los AINEs de este grupo presentan acción antitérmica, analgésica y antiinflamatoria. Todos son capaces de inhibir la ciclooxigenasa, aunque su potencia varía de unos a otros. No obstante, no hay una buena relación entre esta potencia inhibidora y su eficacia analgésica y antiinflamatoria. Así, en su conjunto son considerados como antiinflamatorios de eficacia moderada, incluso inferior a la del AAS, aunque la potencia anticiclooxigenasa de alguno de ellos, como el naproxeno, sea superior.

II.5.3.b.- Características estructurales

Los AINEs de esta familia presentan un centro estereogénico en la cadena carbonada, residiendo la actividad farmacológica únicamente en el enantiómero S(+)²²⁵. Se ha comprobado que el isómero S(+) del ácido 2-(6'-metoxi-2'-naftil)propiónico (Naproxeno) es 28 veces más activo como antiinflamatorio que el isómero R(-)²²⁶ y el isómero S(+) del Ibuprofeno es 160 veces más potente que el R(-). A pesar de esto, la mayoría de las formas farmacéuticas son mezclas racémicas de ambos enantiómeros R(-) y S(+), ya que una vez

administrada la forma racémica el enantiómero R(-) es invertido en S(+)²²⁷, en una proporción que varía de un producto a otro (mucho en el Ibuprofeno y Fenoprofeno, poco en el Flurbiprofeno) y de un individuo a otro. No obstante, se ha comprobado que la conversión de un enantiómero en otro en el organismo no es del 100%: por ejemplo, sólo dos terceras partes del enantiómero R(-) de Ibuprofeno se transforma "in vivo" en el isómero S(+)²²⁸.

Por último, el enantiómero R(-) de la mayoría de los ácidos 2-arilpropiónicos es almacenado en el tejido adiposo²²⁹, donde puede alcanzar elevados niveles.

La obtención de este grupo de AINEs enantioméricamente puros es interesante por las siguientes razones:

- a).- se reduciría la dosis administrada
- b).- disminuirían los efectos secundarios debidos al almacenamiento del enantiómero R(-) en el tejido adiposo²³⁰
- c).- se evitaría la variabilidad de la respuesta terapéutica, al no producirse la inversión total de los enantiómeros R(-) "in vivo"²³¹.

II.5.3.c.- Características farmacocinéticas

En general, los AINEs se absorben completamente, tienen un volumen de distribución pequeño, se unen bastante a proteínas y se acumulan en medios ácidos, como los puntos de inflamación²³². La variabilidad de la respuesta de los pacientes a los diferentes AINEs se explica mediante la dosis y la concentración en plasma²³³.

En la Tabla 10 se resumen las características farmacocinéticas de estos fármacos²³⁴. Grado de absorción (%)(abs); metabolismo presistémico (met); semivida de eliminación (h)(t_{1/2}); volumen de distribución (l)(Vd); grado de unión a proteínas (%)(prot); aclaramiento (ml/kg/min) (Cl) y excreción urinaria (%)(excr)

Tabla 10: Características farmacocinéticas de los AINEs derivados del ácido 2-arilpropiónico.

FARMACO	Abs	met	t_{1/2}	Vd	prot	Cl	excr
Ibuprofeno	>95	--	2	7	99	0,75	< 1
Naproxeno	100	5 %	12-15	6,3	99	0,13	< 1
Ketoprofeno	>90	escaso	1-3	7,7	95	1,2	< 1
Fenbufeno	80	--	10-17	7	98	--	--
Fenoprofeno	80-90	escaso	1,4-3	7	99	0,5-1	2-5
Flurbiprofeno	>95	--	3-6	7	99	0,3	< 15

El Naproxeno e Ibuprofeno presentan farmacocinéticas lineales, al aumenta la dosis también aumenta la concentración plasmática, hasta el punto de la saturación protéica²³⁵.

Todos estos fármacos se absorben completamente por vía oral, con t_{max} comprendido entre 1 y 2 h, excepto el Naproxeno, cuyo t_{max} es de 2-4 h, si bien el de su sal sódica es también de 1-2 h. En general la comida disminuye la velocidad de absorción, pero no la cantidad absorbida. La absorción por vía rectal es más lenta e irregular.

Se unen intensamente a la albúmina, en un 99% a las concentraciones que alcanza en plasma. Cuando la concentración plasmática de albúmina disminuye (artritis reumatoide y ancianos), la fracción libre aumenta.

Difunden bien y pasan al líquido sinovial, donde alcanzan concentraciones que suelen ser la mitad de la plasmática, ya que la concentración de albúmina es menor. Sin embargo, cuando las administraciones son repetidas (tratamientos crónicos) se alcanzan concentraciones que fluctúan menos que las plasmáticas y permiten distanciar más la administración. pasan la barrera placentaria y alcanzan muy bajas concentraciones en la leche.

El metabolismo es intenso y variado, de forma que la excreción renal de forma libre es mínima. El Ibuprofeno R(-) se transforma ampliamente en su enantiómero activo (S+). Entre los procesos metabolizadores destacan los de hidroxilación, desmetilación y conjugación, mayoritariamente con ácido glucurónico.

Las semividas de eliminación son de 2-4 h, excepto en el caso del naproxeno (12-15 h).

II.5.3.d.- Aplicaciones terapéuticas

Los AINEs se utilizan comunmente como tratamiento de primera línea de los trastornos reumatológicos. Contrariamente a los analgésicos opiáceos, no crean adicción y pueden utilizarse durante períodos prolongados de tiempo, pueden administrarse a todos los grupos de edad por distintas vías de administración²³².

Por su actividad antiinflamatoria y analgésica se utilizan en el tratamiento sintomático de la artritis reumatoide, la osteoartritis y la artritis gotosa. Su eficacia es comparable a la del AAS a la dosis de 2-3 g/día; tienen pues una eficacia media. Las dosis varía según el compuesto (Tabla 10). En los tratamientos crónicos se aconseja empezar con dosis bajas para mejorar la tolerabilidad y aumentar paulatinamente la dosis. Los ataques agudos de gota solo responden a las dosis máximas posibles.

Cada vez se utilizan más con fines estrictamente analgésicos, como es el caso del Ibuprofeno y el Naproxeno sódico. Se emplean en el tratamiento de diversas algias como la dismenorrea, los cólicos renales y los dolores postoperatorios de intensidad moderada.

II.5.3.e.- Reacciones adversas

En general son semejantes a las de los otros AINEs, pero la incidencia de alteraciones gastrointestinales es menor que el ácido acetilsalicílico, fenilbutazona o indometacina; no presenta los problemas sanguíneos de las pirazolonas y producen menos molestias neurológicas que la Indometacina. Por esto, se utilizan con frecuencia en situaciones clínicas de intensidad leve o moderada.

Las reacciones adversas que pueden producir son las siguientes: dispepsia, ulceraciones y erosiones gastrointestinales; alteraciones neurológicas como somnolencia, mareo o sedación; erupciones dérmicas y diversas reacciones de hipersensibilidad; incluso puede aumentar el tiempo de hemorragia debido a su acción antiagregante, aunque son muy poco frecuentes las alteraciones hemopoyéticas y hepáticas.

II.5.3.f.- Estrategias para la obtención del enantiómero S(+) puro.

Aunque la síntesis asimétrica por vía química de los ácido S(+) es técnicamente viable, esta metodología no resulta rentable porque son necesarios reactivos de elevado coste y no se obtiene un rendimiento aceptable del enantiómero S(+) puro para su posterior

comercialización²³⁶⁻²³⁸.

Actualmente se ha planteado la resolución de estas mezclas racémicas mediante reacciones enzimáticas catalizadas por lipasas, debido a su amplia especificidad de sustrato, elevada enantioselectividad, gran estabilidad y tolerancia a elevadas concentraciones de sustrato (> 1M)²³⁹, y por el hecho de no requerir cofactor, así como por su disponibilidad comercial y bajo coste económico²⁴⁰.

Siguiendo esta estrategia de catálisis enzimática se han obtenido ácidos R(-) y S(+) 2 aril-propiónicos con diferente grado de pureza enantiomérica (Tabla 11).

Tabla 11: Métodos biotecnológicos de resolución de ácidos 2-aryl-propiónicos catalizados por lipasas.

ACIDO	reacc	R	Nu°	Lipasa	Conv (%)	ee _{Acido}	Ref.
Ibuprofeno	EST	H	propanol	<i>Rh.miehei</i>	15-20	70 (R)	241
	EST	H	pentanol	<i>C.rugosa</i>	49	99 (R)	242
	HID	CH ₂ CH ₃	H ₂ O	<i>C.rugosa</i>	47	99 (S)	243
	HID	CH ₂ CH ₂ Cl	H ₂ O	<i>C.antártica</i>	63	58 (R)	244
Naproxeno	EST	H	butanol	<i>M.javanicus</i>	39	8 (S)	245
	EST	H	butanol	<i>A.niger</i>	23	5 (S)	245
	HID	CH ₃	H ₂ O	<i>Rh.miehei</i>	18	95(R)	246
	HID	CH ₃	H ₂ O	<i>R.oryzae</i>	45	98(S)	246
Ketoprofeno	HID	CH ₂ CF ₃	H ₂ O	<i>Rh.miehei</i>	95	81(R)	247
	HID	CH ₂ CH ₃	H ₂ O	<i>C.rugosa</i>	21	98 (S)	243
Flurbiprofen	HID	CH ₃	H ₂ O	<i>C.rugosa</i>	39	65 (S)	248

EST: reacción de esterificación; HID: reacción de hidrólisis; TRN: reacción de transesterificación

PARTE EXPERIMENTAL

III.1.- MATERIALES

III.1.- REACTIVOS

III.1.1.- Disoluciones tampón

Todas las sales empleadas en la preparación de disoluciones tampón fueron de grado analítico y se utilizaron sin ninguna purificación previa. Todas las disoluciones se prepararon con agua purificada destilada/desionizada (18,2 MΩ de resistividad) en un equipo Barnstead Ropure.

III.1.2.- Disolventes orgánicos

Los disolventes orgánicos empleados durante la realización de esta Memoria han sido los siguientes:

- ciclohexano (99 % de pureza) de Labscan (Dublín, Irlanda).
- hexano (95 %) de Labscan.
- acetonitrilo (99 %) de Labscan.
- iso-butilmetilcetona (4-metil-2-pentanona) (99,5 %) de Sigma.
- 1,4-dioxano (99,8 %) de Sigma.
- éter diisopropílico (99 %) de Sigma.
- iso-octano (2,2,4-trimetilpentano) (99,7 %) de Sigma.
- N,N-dimetilformamida (99 %) de Merck (Darmstadt, Alemania)
- 1,1,1-tricloroetano (99,5 %) de Merck.
- tolueno (99,5 %) de SDS (Peypin, Francia).
- éter etílico (99,5 %) de SDS.
- acetona (99,5 %) de SDS
- heptano de May&Baker Ltd. (Dagenheim, Reino Unido).

Todos estos disolventes se utilizaron sin ninguna manipulación previa, excepto el ciclohexano y el tolueno que se secaron previamente y la acetona, que fue purificada con KMnO_4 , secada y destilada.

III.1.2.a.- Secado de ciclohexano

El ciclohexano rigurosamente anhidro se utilizó como disolvente en las reacciones de síntesis de ésteres de ácidos (R,S) 2-arilpropionicos, en las cuales se quiso analizar la influencia del agua en la actividad de la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* (Lipozyme IM20).

Se colocó a reflujo 1 litro de ciclohexano durante 30 min, con sodio metal y plato poroso. A continuación, se destiló y se recogió sobre tamiz molecular de 4 Å²⁴⁹. Temperatura de ebullición del ciclohexano = 80,7 °C

III.1.2.b.- Secado de 1-butanol

El 1-butanol anhidro se utilizó como sustrato, en las mismas reacciones que el ciclohexano desecado. 60 ml de 1-butanol se colocaron a reflujo con 5 g de magnesio metálico y unas gotas de cloroformo como catalizador, hasta que todo el magnesio se convirtió en butóxido de magnesio. En ese momento se añadieron los 940 ml de butanol restantes y se dejó a reflujo durante 1 h. A continuación, se destiló y se recogió sobre tamiz molecular de 4 Å²⁴⁹. Temperatura de ebullición del 1-butanol = 116 °C.

III.1.2.c.- Secado de tolueno

El tolueno anhidro se utilizó en el proceso de activación de la sílice por el método de la 2,4,6-tricloro-1,3,5,-triazina.

Se dejó el tolueno agitando con cloruro cálcico anhidro en polvo durante una noche. Posteriormente, se filtró con un filtro de pliegues, para eliminar el CaCl₂ y se recogió en un recipiente que contenía sodio en láminas²⁴⁹

III.1.2.d.- Purificación y secado de acetona

La acetona purificada se utilizó para lavar el derivado inmovilizado sobre sílice. Primero se trató la acetona con permanganato potásico (KMnO₄) para oxidar los posibles restos de 2-propanol, para lo cual se colocó a reflujo un volumen determinado de acetona con una punta de espátula de KMnO₄ durante 8 h. A continuación, se filtró para eliminar los restos de MnO₂ y se desecó con carbonato sódico anhidro (Na₂CO₃) poniendolo a reflujo durante 8 h. Se volvió a filtrar con filtro de pliegues para eliminar el agente desecante y se destiló, recogiendo la acetona tratada sobre tamiz molecular de 4 Å²⁴⁹. Temperatura de

ebullición de la acetona = 53 °C.

III.1.3.- Reactivos para la determinación de proteínas

Para realizar la recta de calibrado se usó como patrón la albúmina de suero bovino del laboratorio Sigma Chemical.

III.1.3.a.- Método del biuret

- sulfato cúprico pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) de Merck
- tartrato sódico-potásico tetrahidratado ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) de Merck.
- hidróxido sódico (NaOH) de SDS.

III.1.3.b.- Método de Bradford

- azul brillante de Coomassie G-250 de Aldrich
- ácido orto-fosfórico (H_3PO_4) diluido al 85 % (p/v) en agua de Aldrich.
- etanol al 95 % de SDS.

III.1.4.- Reactivos usados en la inmovilización sobre sílice

La sílice utilizada fue Kieselgel 40 de Merck que presenta las siguientes características texturales: diámetro de partícula: 0,063-0,2 mm, superficie específica: 239 m^2/g ; diámetro medio de poro: 9,5 Å y volumen de poro acumulado: 0,57 cm^3/g

- 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina de Merck
- N,N,N-trietilamina de Aldrich
- cromato de potasio (K_2CrO_4) de Aldrich
- disolución acuosa (0,1014 N) de nitrato de plata (AgNO_3) de Aldrich.

III.1.5.- Soluciones salinas patrón del aparato medidor de actividad de agua

Para la calibración del aparato medidor de actividad de agua se utilizaron soluciones salinas patrón comercializadas por Novasina (Zürich, Suiza).

- * sal-11 (LiCl 70%); $a_w=0,1$; humedad relativa= 11,3 % a 25 °C
- * sal-98 ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 82%); $a_w= 0,9$; humedad relativa= 98 % a 25 °C

III.1.6.- Otros reactivos inorgánicos

- sulfato amónico ((NH₄)₂(SO₄)) de Aldrich
- pentóxido de fósforo (P₂O₅) de Aldrich.
- cloruro cálcico anhidro (CaCl₂) de Panreac (Barcelona, España).
- fosfato sódico monoácido anhidro (Na₂HPO₄) de Merck.
- fosfato sódico diácido anhidro (NaH₂PO₄) de Merck.
- Tris(hidroximetil)aminometano de Merck.
- ácido clorhídrico concentrado (HCl) de SDS.
- ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) de SDS.
- ftalato ácido de potasio de Sigma.
- fosfato potásico diácido (KH₂PO₄) de Panreac

III.2.-ENZIMAS

La enzima objeto de estudio ha sido la lipasa (triacilglicerol acilhidrolasa (EC 3.1.1.3.) de *Rhizomucor miehei* cruda (Lipozyme® 10000L) e inmovilizada (Lipozyme® IM20), ambas suministradas por el laboratorio Novo-Nordisk (Bagsvaerd, Dinamarca)

III.2.1.- Lipasa cruda de *Rh.miehei* (Lipozyme® 10000L)

Lipozyme® 10000L fue obtenida por técnicas de recombinación genética (*ver II.3.2.*)

Las características de esta lipasa son las siguientes²⁵⁰: peso molecular = 30 kD; punto isoléctrico = 4; pH óptimo = 6-8 (en la reacción test de actividad lipásica con tributirina, método AF95 de Novo-Nordisk); T^a óptima = 40-50 °C (en la misma reacción test); densidad= 1,15 g/ml .

Esta lipasa tiene una actividad de 10000 UL/g, donde una Unidad Lipásica (UL) corresponde a la cantidad de enzima que libera un micromol de ácido butírico por minuto en la reacción de hidrólisis de una emulsión de tributirina medida en pH-stato a 30 °C y pH=7,0 ²⁵⁰

III.2.2.- Lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* (Lipozyme® IM20)

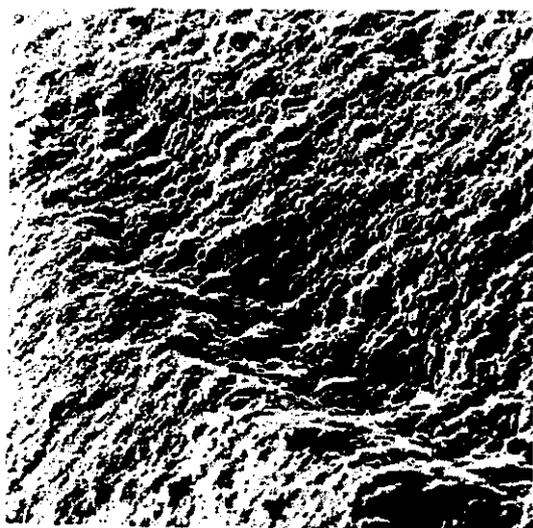
La lipasa de *Rh.miehei* se presenta en forma inmovilizada sobre una resina macroporosa de intercambio aniónico por adsorción iónica. El derivado obtenido es

comercializado por el laboratorio Novo-Nordisk con el nombre de (Lipozyme[®] IM20)²⁵¹

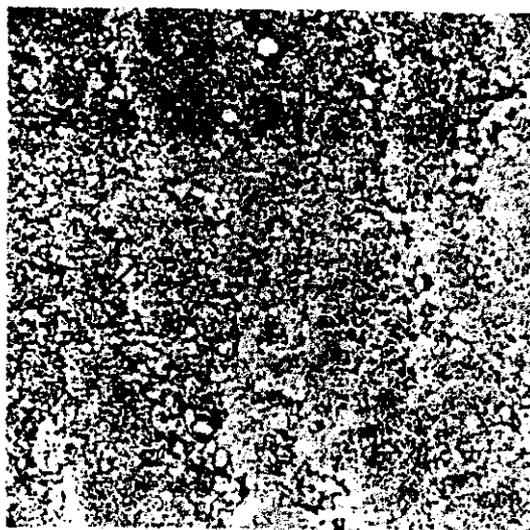
La resina macroporosa de intercambio aniónico utilizada es Duolite A-568 de Duolite International (París, Francia). Este soporte es una resina granular, porosa y de carácter debilmente básico. El polímero es un policondensado reticulado de fenol-formaldehido, de carácter hidrófilo y con una distribución de tamaño de poro controlada²⁵²

Las características físicas de la resina Duolite A-568 son las siguientes: tamaño de partícula: 0,3-0,6 mm; radio de poro: 50-300 Å y superficie específica: 200 m²/g ²⁵²

En la Figura 23^b se muestra una microfotografía del soporte (Figura A) sin enzima y (Figura B) con enzima (derivado Lipozyme[®] IM20)²⁵¹



(a)



(b)

Figura 23^b: Microfotografía del soporte del derivado Lipozyme[®] IM20 (a) sin enzima y (b) con lipasa de *Rh.miehei* adsorbida..

El tamaño de partícula de Lipozyme IM20[®] oscila entre 0,3 y 0,6 mm. El contenido en agua de este derivado inmovilizado es del 10 % (p/p)²⁵³

Lipozyme[®] IM20 tiene una actividad de 43 UI/g, donde una unidad de interesterificación (UI) se define como la cantidad de lipasa que cataliza la incorporación de 1 μmol de ácido palmítico a trioleína por minuto a 40 °C, alcanzando la máxima actividad a 70 °C ²⁵¹

III.3.- SUSTRATOS

III.3.1.- Actividad esterásica

Para la determinación de la actividad esterásica se empleó como sustrato el acetato de *p*-nitrofenilo de Sigma (St.Louis, EEUU).

III.3.2.- Actividad lipásica

Para determinar la actividad lipásica se emplearon dos sustratos, según el método utilizado:

Sustrato Sigma: Emulsión de aceite de oliva al 50 % (v/v) de Sigma (St.Louis, EEUU)

Tributirina de Aldrich (Steinheim, Alemania) al 98 % de pureza. Diariamente se preparó una emulsión de tributirina, utilizando como emulsificante una disolución acuosa de goma arábica, glicerina, NaCl y KH_2PO_4 .

- goma arábica de Sigma
- glicerina de Aldrich
- cloruro sódico de Panreac
- fosfato potásico diácido (KH_2PO_4) de Panreac

III.3.3.- Síntesis de ésteres

III.3.3.a.- ácidos (R,S) 2-arilpropiónicos

- * Ibuprofeno (ácido (R,S) 2-(4-isobutilfenil)propiónico) de Boots (Nottingham, Reino Unido)
- * ácido (R,S) 2-fenilpropiónico de Fluka (Buchs, Suiza)
- * Naproxeno (ácido (R,S) 2-(6-metoxi-2-naftil)propiónico) de Syntex (Palo Alto, EEUU)
- * Ketoprofeno (ácido (R,S) 2-(3-benzoílfenil)propiónico) de Menarini (Badalona, España)

III.3.3.b.- alcoholes

1-butanol, 3-metil-1-pentanol, 1-octanol, ciclohexanol y 2-propanol de Sigma.

III.2.- PROGRAMAS DE CALCULO

III.2.1.- SIMFIT

A lo largo de esta Tesis Doctoral se ha utilizado como herramienta de cálculo el paquete integrado SIMFIT versión 4.0. para llevar a cabo el ajuste de los datos experimentales a determinadas ecuaciones matemáticas.

Este paquete informático, diseñado por W.G. Bardsley²⁵⁴, escrito en lenguaje Fortran compilado y desarrollado en base a rutinas de regresión no lineal de la librería "NAG Workstation", emplea algoritmos de optimización matemática por iteración con el objetivo de minimizar la función Sumatorio de Residuales (SSQ), definida mediante el método de mínimos cuadrados.

La función SSQ se define como:

$$SSQ = \sum_i (y_i - y_i)^2 \quad [19]$$

donde, y_i = dato experimental obtenido para la variable independiente "y", cuando la variable dependiente "x" adopta el valor " x_i ".

y_i = valor calculado para la variable dependiente "y", cuando $x = x_i$, utilizando para ello la función con los parámetros calculados.

Las suposiciones estadísticas en las que se basa el criterio de los mínimos cuadrados son: que la ecuación por ajustar es la correcta, el error en la respuesta es estrictamente aditivo y los errores son independientes entre sí y siguen una distribución homocedástica (varianza constante), esto es, las medidas se han hecho con la misma precisión. Este tipo de regresión se denomina regresión sin pesos estadísticos.

No obstante, la mayoría de las veces las medidas experimentales siguen una distribución heterocedástica (diferente varianza), y se hace necesario dar más "importancia" (más peso) a los datos de menor error frente a los de más error. Para ello, lo que se hace es corregir los residuales con un factor llamado peso estadístico, (w_i), que es inversamente proporcional a la varianza de los datos (el cuadrado de la desviación estándar).

$$w_i = \frac{1}{S_i^2} \quad [20]$$

De esta forma, la función que se optimiza se denomina sumatorio ponderado de residuales (WSSQ), que se define como:

$$WSSQ = \sum (1/S_i^2) (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad [21]$$

La desviación estándar en las mediciones de la variable dependiente se determina mediante réplicas. De esta forma, se le asigna a cada conjunto de medidas (y_i) su desviación estándar correspondiente, que se utiliza para ponderar el error. No obstante, esta metodología es recomendable siempre que el número de réplicas obtenidas por cada valor de la variable "y" sea mayor o igual a 3. Como ésto no es factible en muchas ocasiones, otra metodología que puede sugerirse consiste en determinar el error experimental promedio que tiene el método, y asignar a cada punto dicho error experimental como error relativo constante. Generalmente se toma como valor de dicho error el 5 %.

Como parámetros que cuantifican la bondad del ajuste, el paquete SIMFIT calcula el valor del coeficiente de determinación (R^2). Por otra parte, cuando se utilizan como pesos estadísticos las desviaciones típicas de los errores (o estimaciones de las mismas), la función WSSQ sigue una distribución ji-cuadrado (X^2) con "g" grados de libertad, siendo $g = n^\circ$ de puntos experimentales - n° de parámetros de ajuste. De esta forma, por comparación del valor de ji-cuadrado con WSSQ se puede establecer la bondad del ajuste. El programa Simfit calcula automáticamente la probabilidad de que ji-cuadrado exceda el valor de WSSQ. Así, cuando la probabilidad de que ji-cuadrado sea mayor de WSSQ es menor de 0,01 (nivel de significancia del 1 %) o menor de 0,05 (nivel de significancia del 5 %), se debería rechazar el ajuste utilizando dichos niveles de significación.

Simfit también permite establecer criterios de bondad de ajustes a través del estudio de los residuales, los cuales, en un ajuste óptimo deberían quedar distribuidos al azar y no deberían presentar una correlación serial significativa, por lo que el número de residuales positivos y negativos debe ser similar, y no debe haber series largas de residuales con el mismo signo, ni tampoco muy pocas series. El número de residuales positivos se designa con

la letra "n", el de residuales negativos con la letra "m" y el número de series con "r". Simfit establece dos tests acerca de las series, que deben dar una probabilidad (p) comprendida entre $\alpha/2$ y $1-\alpha/2$ ($\alpha= 0,05$ ó $0,01$, según el nivel de significancia con el que se trabaje). La prueba de los signos, también desarrollada por este programa, debe dar una probabilidad $p \geq \alpha$, para poder considerar el ajuste como bueno. Un nuevo estadístico que el programa calcula es el test de Durbin-Watson, que indica la posibilidad de que exista una correlación seriada, esto es, que el signo que presente un residual venga impuesto por el signo del anterior. Normalmente, cuando el valor de dicho estadístico está comprendido entre 1,5 y 2,5, se puede descartar dicho efecto.

Es frecuente que los parámetros del ajuste deban ser distintos de cero, pues el hecho de anularse suele conllevar el que la variable respuesta "y" no dependa de alguna variable explicativa "x", o que lleve consigo una simplificación del modelo debido a la desaparición de una parte funcional del mismo. Así, para determinar si un parámetro puede considerarse nulo o no, éste se mide en unidades estándar, es decir, se calcula el cociente:

$$T = \frac{\text{valor estimado del parámetro}}{\text{error estándar de su estimación}} \quad [22]$$

si el valor de este cociente T está dentro de ciertos límites (que se consultan en las tablas estadísticas de la "t" de Student, considerando como grados de libertad ($g = n^\circ \text{ puntos} - n^\circ \text{ parámetros}$), puede ser que el parámetro se anule; si por el contrario, el valor de T rebasa esos límites, entonces el valor del parámetro es distinto de cero. El programa Simfit suministra toda esta información mediante un parámetro de redundancia.

III.2.2. HIPERCHEM

Los cálculos de Mecánica y Dinámica Molecular de la estructura de los ácidos (R,S) 2-arilpropionicos, objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral, se realizaron con el programa HIPERCHEM²⁵⁵.

El estudio por Dinámica Molecular de estos compuestos se realizó a alta temperatura debido a la mayor eficacia para atravesar barreras de energía en el espacio conformacional multidimensional²⁵⁶. Se eligió una temperatura de 100 °K como punto de partida, ya que

permite a la molécula explorar un número de conformaciones separadas por barreras energéticas significativas. Para evitar el riesgo inherente a toda simulación de Dinámica Molecular a alta temperatura, de que la estructura encontrada corresponda a un mínimo local de alta energía se realizaron con cada una de los conformeros obtenidos procesos de dinámica molecular sucesivas de 1ps ($T= 450 \text{ }^\circ\text{K}$), 10ps ($T= 350 \text{ }^\circ\text{K}$) y 12 ps ($T= 300 \text{ }^\circ\text{K}$).

Finalmente, la geometría de los conformeros de mínima energía obtenidos de los ácidos (R,S) 2-arilpropiónicos se analizó por Mecánica Molecular mediante el uso del método MM+ como campo de fuerzas. Primeramente se utilizó el algoritmo "steepest descent" de forma interactiva hasta un gradiente de $0,1 \text{ kcal/mol } \text{Å}$. Una vez optimizada esta estructura se procedió a una nueva optimización utilizando el algoritmo "Fletcher-Reeves" con gradiente conjugado hasta un valor de gradiente $0,02 \text{ kcal/mol } \text{Å}$, que permitió considerar los efectos de la conjugación de dobles enlaces, tan importante a priori, en las moléculas objeto de estudio.

III.3.- CARACTERIZACION DE LA LIPASA DE *Rhizomucor miehei*.

La caracterización de la lipasa de *Rhizomucor miehei* se centró en los siguientes puntos:

- 1).- Determinación de la concentración de proteínas
- 2).- Determinación de la actividad esterásica
- 3).- Determinación de la actividad lipásica
- 4).- Estudios de abrasión del derivado inmovilizado comercial de la lipasa de *Rh.miehei* (Lipozyme® IM20)
- 5).- Electroforesis

III.3.1.- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS.

La determinación de la cantidad de proteínas de la lipasa de *Rh.miehei* se hizo empleando métodos espectrofotométricos. El método de rutina fue el metodo del Biuret, aunque para la determinación de la lipasa semipurificada por precipitación con sulfato amónico se empleó el método de Bradford, para evitar posibles interferencias entre los grupos amino de la proteína y del sulfato amónico al reaccionar con las sales de cobre del reactivo de biuret.

En los dos métodos el patrón de proteína utilizado para la elaboración de las correspondientes rectas de calibrado fue albúmina de suero bovino (BSA).

III.3.1.a.- Método del biuret

Para la determinación rutinaria de la concentración de proteínas de la lipasa empleada utilizamos el método espectrofotométrico del Biuret, basado en la formación de un compuesto coloreado como resultado de la reacción, en medio alcalino, de los enlaces peptídicos de las proteínas y las sales de cobre que forman parte del reactivo del biuret²⁵⁷⁻²⁵⁹. La intensidad de color del compuesto formado será proporcional a la concentración protéica de la muestra.

Reactivo del biuret

Se disolvieron 1,5 g de sulfato cúprico pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y 6,0 g de tartrato sódico-potásico tetrahidratado ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en 500 ml de agua destilada. A

continuación se añadieron, con agitación constante, 300 ml de NaOH al 10% (p/v) y se completó hasta 1 l con agua destilada. Este reactivo se debe guardar en botellas de plástico; el almacenaje puede ser indefinido, pero debe desecharse si aparecen depósitos. La adición de yoduro potásico (IK) al 1% (p/v) aumenta la estabilidad del reactivo y no tiene efecto apreciable sobre la calidad del mismo.

Patrón de proteína

Se prepararon diluciones de distinta concentración (2 diluciones para cada concentración) de albúmina de suero bovino (BSA) diluida en agua.

Procedimiento experimental

Las medidas de la intensidad de color del compuesto formado se realizaron empleando un espectrofotómetro UV-visible Shimadzu UV-2100 a una $\lambda=545$ nm, correspondiente a la longitud de onda de máxima absorción del compuesto coloreado.

Primero se realizó una recta de calibrado colocando en cada tubo de ensayo 1 ml de cada dilución de albúmina de suero bovino y 4 ml del reactivo de biuret (volumen total = 5 ml). Se agitó cada tubo y se dejó incubando, para que se desarrollara la reacción, a temperatura ambiente durante 30 min o a 37 °C durante 20 min. El color observado al término de este período de incubación, es estable durante al menos 1 h. Debe realizarse un ensayo en blanco colocando en un tubo 1 ml de agua y 4 ml del reactivo de biuret a fin de evitar errores sistemáticos.

Los parámetros del ajuste de la recta de calibrado, realizado con el programa SIMFIT, considerando un 5 % de error relativo constante para cada punto, aparecen a continuación (ecuación 23):

$$\text{Absorbancia} = (0,238 \pm 0,004) [\text{proteínas (mg/ml)}] + (0,049 \pm 0,001) \quad [23]$$

$$N = 20$$

$$R = 0,997$$

$$t_{\text{exp}} = 54,1$$

$$t_{1,18 (\alpha=0,05)} = 1,73$$

$$F_{\text{SNDexp}} = 2923$$

$$F_{1,18 (\alpha=0,05)} = 3,0$$

dado que F_{SNDexp} es mayor que $F_{\text{SNDtabulada}}$, la ecuación es efectivamente significativa con, al menos, un 95 % de certeza.

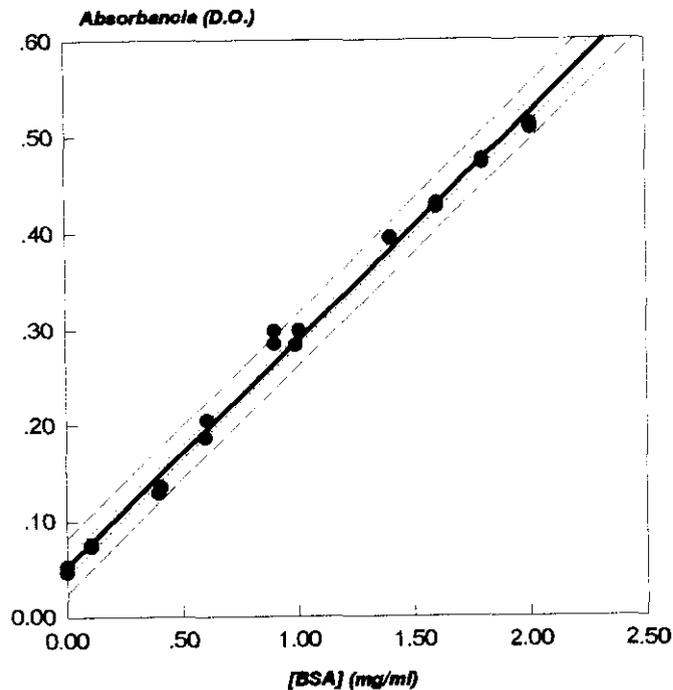


Figura 24: Recta de calibrado del método del biuret con seroalbúmina bovina, considerando un 95 % de certeza.

En la Figura 24 aparecen, además de la recta de calibrado (—), el intervalo de confianza (.....) y el intervalo de predicción (---).

El intervalo de confianza describe los límites entre los que estarán comprendidos los valores de la recta de regresión con un 95 % de probabilidad.

El intervalo de predicción indica los límites entre los que estarán comprendidos los valores de los ensayos puntuales que se realicen, en las mismas condiciones experimentales, con un 95 % de probabilidad y serán los valores extremos que se utilicen como límites de confianza al utilizar dicha recta como curva de calibración.

Muestra problema

La determinación del contenido protéico de la lipasa cruda de *Rh.miehei* se realizó, para cada uno de los lotes suministrados por Novo-Nordisk, por triplicado, tomando 1 ml de una dilución en agua 1/5 (v/v) de dicha preparación enzimática y añadiéndole 4 ml de reactivo de biuret y posterior medida de la absorbancia a 545 nm. Para cuantificar la cantidad de

proteína se empleó la recta de calibrado antes indicada (ecuación 23). La concentración de proteínas de los lotes de lipasa cruda de *Rh.miehei* suministrados osciló entre 66,5 mg/ml y 62,6 mg/ml. A efectos prácticos se considerará el siguiente valor estándar: (64±2) mg/ml, medido con un 95 % de certeza.

III.3.1.b.- Método de Bradford

Este método, como se ha indicado anteriormente, se utilizó para determinar la concentración de proteínas de la lipasa de *Rh.miehei* semipurificada por precipitación con sulfato amónico ((NH₄)₂SO₄).

El método de Bradford se basa en la adsorción de la proteína al azul brillante de Coomassie G-250, lo que provoca un cambio en el espectro de absorción visible del colorante, desplazando el pico de absorbancia máxima desde 465 nm hasta 595 nm²⁶⁰

Reactivo de Coomassie

Se disolvieron 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol al 95%, se añadieron 100 ml de ácido orto-fosfórico al 85 % (p/v) y se completó hasta 1 l con agua. El reactivo se mantuvo 24 h en oscuridad, guardado en un frasco topacio. Transcurrido ese tiempo se filtró.

Patrón de proteína

Se preparó una dilución de 1 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) en agua.

Procedimiento experimental

Se colocó en cada tubo de ensayo una cantidad conocida de la disolución de albúmina de suero bovino; se completó con agua hasta un volumen de 0,1 ml y se añadieron 5 ml de reactivo de Coomassie. Se agitó bien e inmediatamente se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UV-vis a $\lambda=595$ nm. La medida debe hacerse inmediatamente porque la adsorción de la proteína al reactivo de Coomassie se produce casi instantáneamente y es máxima y estable entre los primeros 5 y 20 primeros minutos. Cada punto experimental se midió por triplicado.

Los parámetros del ajuste de la recta de calibrado, realizado con el programa SIMFIT,

considerando la desviación estándar para cada grupo de tres medidas, aparecen a continuación:

Los parámetros y la ecuación de la recta de calibrado obtenida, considerando una regresión lineal con pesos estadísticos proporcionales a la desviación estándar de cada grupo de tres medidas, es la siguiente:

$$\text{Absorbancia} = (0.0092 \pm 0.0003)[\text{proteínas } (\mu\text{g})] + (0,43 \pm 0.01) \quad [24]$$

$$N = 21 \qquad R = 0,991$$

$$t_{\text{exp}} = 31,87 \qquad t_{1,19} (\alpha=0,05) = 1,73$$

$$F_{\text{SNDexp}} = 1016 \qquad F_{1,19} (\alpha=0,05) = 2,99$$

dado que F_{SNDexp} es mayor que $F_{\text{SNDtabulada}}$, la ecuación es efectivamente significativa con, al menos, un 95 % de certeza.

En la Figura 25 se representan, además de la recta de regresión, el intervalo de confianza y el intervalo de predicción (ver III.3.1.a.).

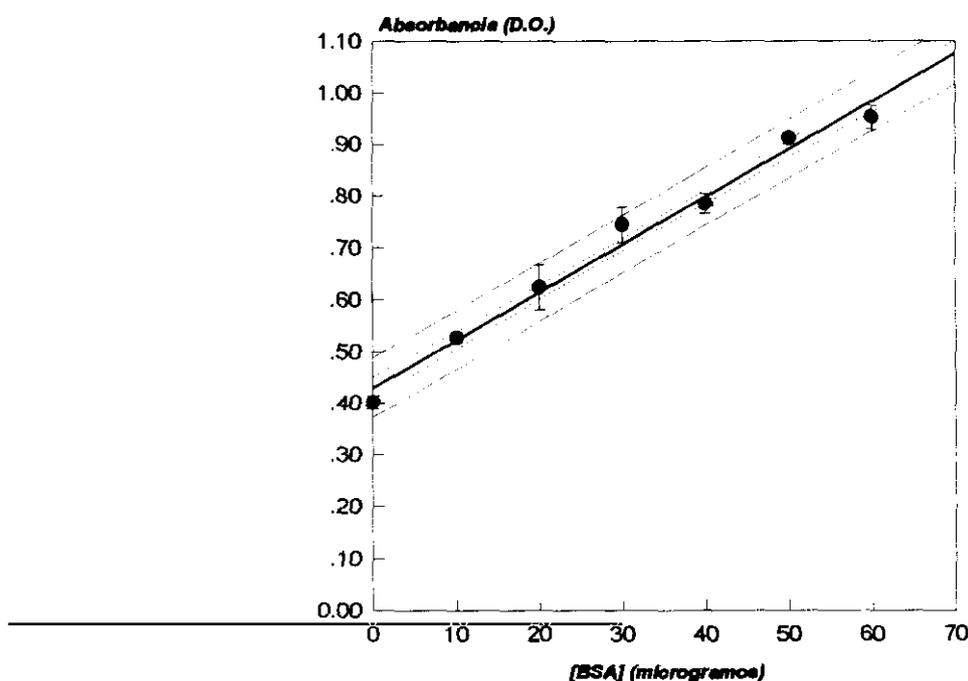


Figura 25: Recta de calibrado del método de Bradford con seroalbúmina bovina.

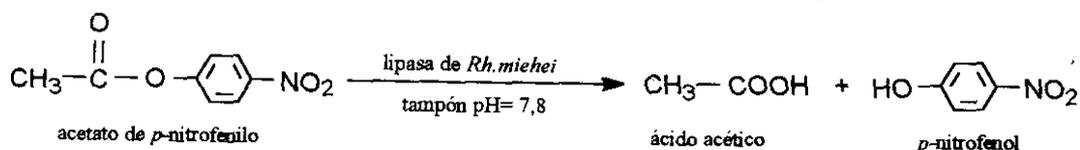
Muestra problema

Este método solo se utilizó para la determinación del contenido protéico del lote de la lipasa cruda de *Rh.miehei* que posteriormente fue sometido a un tratamiento de semipurificación por precipitación con sulfato amónico, para comprobar la variación del contenido proteico tras el proceso. En cada caso se tomaron 5 ml del reactivo de Coomassie y 0,1 ml de la dilución enzimática por analizar; dicha disolución enzimática fue 1/10 (v/v) en agua para la lipasa cruda y 1/6 (v/v) para la lipasa semipurificada. Todos los ensayos se hicieron por triplicado y se midió la absorbancia a 595 nm. Para cuantificar la cantidad de proteínas se empleó la recta de calibrado indicada anteriormente (ecuación 24).

De esta forma, la concentración de proteínas obtenida, por este método, para la lipasa cruda de *Rh.miehei* suministrada por Novo-Nordisk osciló entre 8,4 mg/ml y 7,7 mg/ml. El valor promedio que se consideró fue: $(8,1 \pm 0,3)$ mg/ml, considerado con un 95 % de certeza.

III.3.2.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ESTERASICA

La actividad esterásica de la lipasa cruda de *Rh.miehei* se determinó en función de la cantidad de *p*-nitrofenol liberado durante la reacción de hidrólisis, en medio alcalino (pH=7,8), del acetato de *p*-nitrofenilo. El aumento de absorbancia producido a 400 nm se correlaciona con la cantidad de *p*-nitrofenol liberado. (pKa del *p*-nitrofenol = 7,04)



Esquema 21: Reacción de hidrólisis del acetato de *p*-nitrofenilo.

Reactivos

- * sustrato: disolución de acetato de *p*-nitrofenilo (pNPA) en acetonitrilo (0,75 mM)
- * tampón de trabajo: Tris-HCl (0,1M) pH=7,8

Espectros de absorción

Para establecer la longitud de onda de estudio de la reacción de hidrólisis del acetato de *p*-nitrofenilo se obtuvieron los espectros de absorción UV-vis del sustrato (acetato de *p*-nitrofenilo) y del producto (*p*-nitrofenol), para comprobar la longitud de onda de trabajo en

la cual la absorbancia del *p*-nitrofenol debe ser máxima, mientras que la absorbancia del acetato de *p*-nitrofenol debe ser nula.

Se preparó una disolución (0,1M) de acetato de *p*-nitrofenilo en acetonitrilo. A continuación, en la cubeta del espectrofotómetro se colocaron 0,1 ml de dicha disolución y 2,4 ml del tampón de trabajo (Tris-HCl (0,1M) pH=7,8), para que las condiciones en las que se realizó el espectro fueran similares a las condiciones de reacción. El mismo procedimiento se siguió con el *p*-nitrofenol.

Comparando los espectros de la Figura 26 se tomó la longitud de onda de 400 nm para dicho estudio.

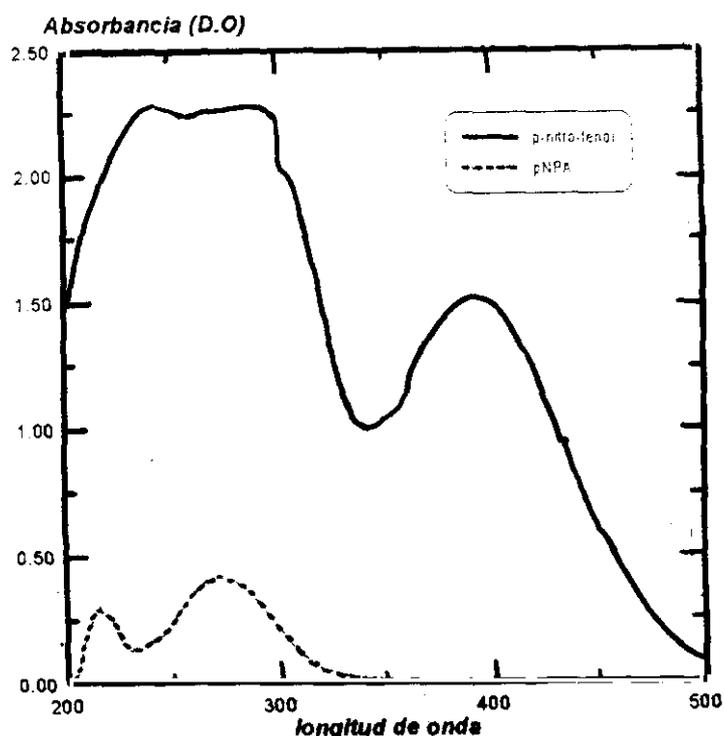


Figura 26: Espectros de absorción UV-vis del acetato de *p*-nitrofenilo y del *p*-nitrofenol

Reacción de hidrólisis del acetato de *p*-nitrofenilo.

En la cubeta de muestra se colocaron 2,4 ml de tampón Tris-HCl (0,1 M) pH= 7,8 y un volumen determinado de lipasa cruda de *Rh.miehei*, colocando agua como referencia en la otra cubeta. La reacción se disparó al añadir un volumen determinado de una disolución de acetato de *p*-nitrofenilo en acetonitrilo (2,5 mM). La reacción se llevó a cabo a 37 °C,

cuantificando el incremento de absorción, debido a la liberación de *p*-nitrofenol, a $\lambda = 400$ nm durante 100 s. La velocidad inicial se calculó ajustando el primer tramo de la curva absorbancia-tiempo a una recta y midiendo su pendiente, la cual se expresó como $\Delta Abs_{max}/min$. Para correlacionar esta medida con los moles de sustrato hidrolizado se realizó una recta de calibrado (ecuación 25) en la que se representó la absorbancia final de cada ensayo frente a la concentración de sustrato en la cubeta de reacción (Figura 27). Para obtener el valor de absorbancia final se dejó transcurrir la reacción hasta alcanzar la saturación.

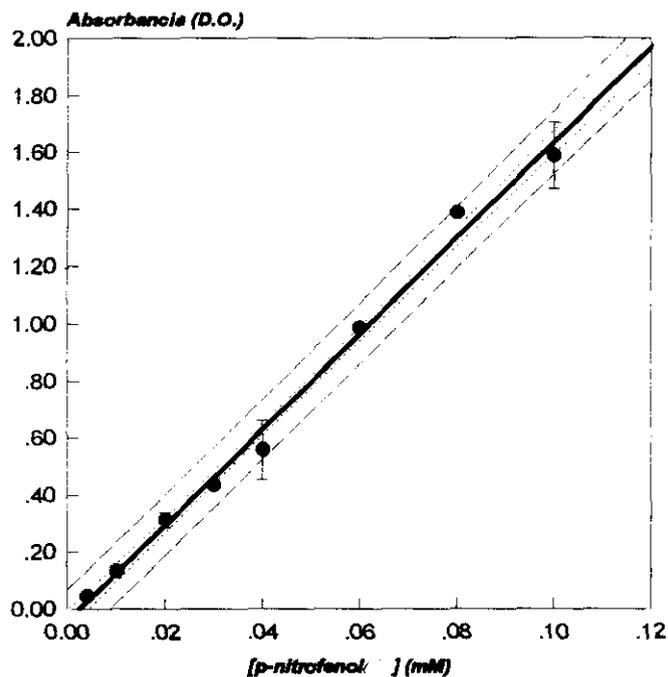


Figura 27.: Recta de calibrado del *p*-nitrofenol

Los parámetros y la ecuación de la recta de calibrado obtenida, considerando una regresión lineal con pesos estadísticos proporcionales a la desviación estándar de cada grupo de tres medidas, es la siguiente:

$$\text{Absorbancia} = (18,6 \pm 0,2) [\text{pNPA (mM)}] - (0,115 \pm 0,009) \quad [25]$$

$$N = 24$$

$$R = 0,996$$

$$t_{\text{exp}} = 51,8$$

$$t_{1,22 (\alpha=0,05)} = 1,72$$

$$F_{\text{SNDexp}} = 2686$$

$$F_{1,22 (\alpha=0,05)} = 2,96$$

dado que $F_{SND_{exp}}$ es mayor que $F_{SND_{tabulada}}$, la ecuación es efectivamente significativa con, al menos, un 95 % de certeza.

El valor de la pendiente de esta recta, según la ley de Lambert-Beer, equivale al coeficiente de extinción molar (ϵ) del *p*-nitrofenol en estas condiciones.

$$\epsilon = (18,6 \pm 0,2) \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

De esta forma, al cuantificar el coeficiente de extinción molar (ϵ) del producto de la hidrólisis enzimática del pNPA, se pueden convertir los datos de $\Delta\text{Abs} / \text{min}$, calculados por el espectrofotómetro UV-visible, en medidas de $\Delta[c] / \Delta t$. Este incremento, cuantificado durante los primeros 100 s, permite calcular la velocidad inicial de hidrólisis, parámetro que se empleará como medida de la actividad esterásica de las preparaciones enzimáticas analizadas.

III.3.3.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LIPASICA

La actividad lipásica se determinó empleando tres métodos, dos de ellos basados en la hidrólisis de aceite de oliva y uno basado en la hidrólisis de tributirina.

Para el método de la tributirina y para uno de los métodos con aceite de oliva los ensayos se llevaron a cabo en un sistema potenciométrico de valoración a pH constante (pH-stato) de la casa Crison formado por:

- unidad central: Micrott 2022
- unidad de valoración: Microbur 3031
- unidad de agitación: Microstirrer 2038
- electrodo combinado de pH
- módulo registrador: impresora Epson LX-800
- baño de termostatación del reactor.

III.3.3.a.- Hidrólisis del aceite de oliva.

Para la hidrólisis del aceite de oliva (emulsión al 50% (v/v) de la casa Sigma) se emplearon dos métodos, ambos basados en la valoración volumétrica del ácido liberado durante la reacción de hidrólisis catalizada por la lipasa de *Rh.miehei*, usando como agente valorante una disolución de NaOH 1mM. En el método A el ácido liberado se neutralizó durante el transcurso de la reacción empleando un pH-stato. En el método B la valoración se hizo a "punto final".

III.3.3.a.1.- Método A

Reactivos

- * *sustrato Sigma*: emulsión de aceite de oliva al 50 % (v/v) con 0,1 % de azida sódica como conservante, de la casa Sigma. Este sustrato se diluyó previamente al 20 % en tampón de trabajo.
- * *tampón de trabajo*: tampón fosfato (2mM) pH=7,2
- * *disolución valorante*: NaOH (1mM) de factor = $(0,988 \pm 0,002)$, valorada previamente con ftalato ácido de potasio.

Procedimiento experimental:

En la cubeta de reacción del pH-stato se añadieron 4 ml de tampón fosfato (2 mM) pH=7,2 y un volumen determinado de lipasa cruda de *Rh.miehei*. La mezcla se dejó agitando durante 5 min para que la homogeneización alcanzase la temperatura deseada. Posteriormente, se ajustó el pH del medio a 7,0, adicionando unas gotas de una disolución de NaOH, y se añadió un volumen determinado de una disolución 36 mM de sustrato Sigma en tampón. Las velocidades iniciales se midieron utilizando un método de valoración a pH fijo, con agitación constante y a 37 °C, valorando el ácido liberado con una disolución de NaOH (1 mM) $f = (0,988 \pm 0,002)$.

El dato de velocidad enzimática inicial se obtuvo ajustando el tramo inicial de la curva, obtenida al representar los mililitros de la disolución de NaOH adicionados por minuto, a una recta y calculando su pendiente, la cual se expresó en mmoles de ácido hidrolizado por minuto.

III.3.3.a.2.- Método B.

Este método ha sido descrito por la casa Sigma para la determinación de lipasas en suero (Sigma, protocolo n° 800), basado en el método de Tietz y Fiereck²⁶¹ y consiste en la valoración volumétrica, al final de la reacción, del ácido total liberado durante la reacción de hidrólisis.

Reactivos

- * *sustrato Sigma*: emulsión de aceite de oliva al 50 % (v/v), con 0,1 % de azida sódica como conservante.
- * *tampón de trabajo*: Tris-HCl (0,2 M) pH=8,0
- * *etanol* al 95 %
- * *indicador*: timolftaleína al 0,9 % (p/v) en etanol
- * *disolución valorante*: NaOH (0,05 M) de factor = $(1,084 \pm 0,003)$ valorada con ftalato ácido de potasio.

Procedimiento experimental

Se elaboró una recta de calibrado de la cantidad de ácido hidrolizado frente a los miligramos de proteína, haciendo ensayos por triplicado para distintas cantidades de lipasa nativa de *Rh.miehei*.

Para cada cantidad de lipasa se prepararon tres tubos de ensayo con 1,2 ml de agua, 0,5 ml de sustrato Sigma, 1,5 ml de tampón de trabajo y una cantidad variable de lipasa de *Rh.miehei*. Los tubos se agitaron y se dejaron incubando durante 3 h a 37 °C para que la reacción de hidrólisis se desarrollara. Paralelamente, se realizaron ensayos en blanco, por triplicado para cada cantidad de lipasa, con agua en lugar de Lipozyme® 10000L y se dejaron incubando en las mismas condiciones.

Al cabo de las tres horas se vertió el contenido de cada tubo en su correspondiente erlenmeyer, en el que previamente se había adicionado 1,5 ml de etanol y 4 gotas de timolftaleína. El ácido liberado se valoró añadiendo NaOH (0,05M) hasta que la dilución viró de incoloro a rosa. Se calculó la cantidad media de NaOH gastada en los tres ensayos realizados para cada cantidad de lipasa y se le restó la cantidad media gastada en los correspondientes ensayos en blanco; los ml de NaOH que resultan de esa diferencia se

multiplicaron por un factor de conversión (280) de unidades lipásicas convencionales en unidades lipásicas internacionales²⁶¹

El ensayo se realizó para un intervalo de concentración de proteínas entre 0,7 y 53,3 mg, pero el tramo recto de la curva UI/l mgproteína solo llegó hasta 40 mg proteína; por lo tanto, ese es el intervalo que se consideró para la recta de calibrado.

Los parámetros y la ecuación de la recta de calibrado obtenida, considerando una regresión lineal con pesos estadísticos proporcionales a la desviación estándar de cada grupo de tres medidas, es la siguiente:

$$\text{actividad hidrolítica (UI/l)} = (16 \pm 2) (\text{mg proteína}) + (1635 \pm 37) \quad [26]$$

$$N = 24$$

$$R = 0,833$$

$$t_{\text{exp}} = 7,06$$

$$t_{1,22} (\alpha=0,05) = 1,18$$

$$F_{\text{SNDexp}} = 49,9$$

$$F_{\text{SND } 1,22} (\alpha=0,05) = 1,39$$

dado que F_{SNDexp} es mayor que $F_{\text{SNDtabulada}}$, la ecuación es efectivamente significativa con, al menos, un 95 % de certeza.

En la Figura 28 se representaron, además de la recta de regresión, el intervalo de confianza y el intervalo de predicción.

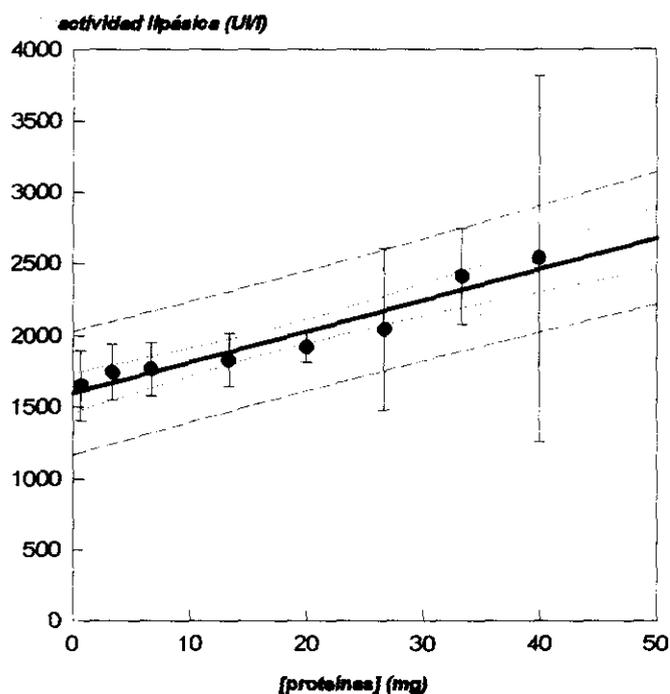


Figura 28: Recta de calibrado de actividad lipásica frente a cantidad de proteína, con 95 % de certeza.

En las reacciones con lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* (Lipozyme[®] IM20) el procedimiento experimental seguido fue muy similar al de la lipasa nativa, con la única diferencia de que se añadieron 3ml de agua, en los tubos donde se desarrolló la reacción, para aumentar el volumen y poder observar mejor el viraje de color durante la valoración volumétrica.

III.3.3.b.- Hidrólisis de tributirina

Este método, que es experimentalmente semejante al método A de hidrólisis de aceite de oliva, se basa en la determinación de la actividad lipásica en función de la hidrólisis de tributirina catalizada por ambas enzimas. Este es el método recomendado por Novo-Nordisk para la determinación de la actividad lipásica²⁵⁰

Reactivos

- * *sustrato*: tributirina emulsificada. La emulsión se preparó diariamente y se mantuvo con agitación constante. En un matraz de 100 ml se añadieron 5 ml de tributirina, 16,6 ml de emulsificante y se completó con agua. A continuación, se sonicó en un baño de agua durante 15 min.
- * *emulsificante*: se prepara cada mes. En un vaso de precipitados se añadieron 8,95 g de cloruro sódico (NaCl), 0,20 g de fosfato potásico diácido (KH₂PO₄), 200 ml de agua y 270 ml de glicerina. Se agitó la mezcla y se adicionaron poco a poco 3 g de goma arábica; cuando todo estuvo bien disuelto se pasó a un matraz de 500 ml y se enrasó con agua.
- * *solución valorante*: NaOH (0,05M) $f = (0,975 \pm 0,001)$, valorada previamente con ftalato ácido de potasio.

Procedimiento experimental

Para un ensayo estándar, en la cubeta del pH-stato se añadieron 5 ml de tributirina emulsificada y 5 ml de agua y una cantidad determinada de lipasa. Se ajustó el pH del medio a 7,0 y comenzó la valoración volumétrica con NaOH (0,05 M) $f = (0,975 \pm 0,001)$.

Para determinar la actividad lipásica se tomó el tramo inicial de la curva de valoración y se calculó su pendiente. La velocidad enzimática inicial se cuantificó siguiendo el mismo

procedimiento que en el método A de hidrólisis de aceite de oliva.

III.3.4.- DESORCION POR ABRASION DE LA LIPASA INMOVILIZADA DE *Rhizomucor miehei*

Se intentó separar la enzima inmovilizada comercial (Lipozyme® IM20) de su soporte, sometiéndola a la acción de un medio fuertemente ácido (HCl 0,1M), otro medio fuertemente alcalino (NaOH 0,1M) y un medio neutro (tampón Tris-HCl (0,1M) pH=7,0), para lo cual, se prepararon 3 lotes de 300 mg de Lipozyme® IM20 y cada uno de ellos se suspendió en 10 ml del correspondiente medio. Las disoluciones se mantuvieron en agitación durante 96 h en un baño termostatzado a 37 °C. Pasado ese tiempo, se filtraron con una placa filtrante del n° 4 y se determinó la concentración de proteínas (por el método del Biuret; *ver III.3.1.a.*) en los líquidos de filtrado, para comprobar si la enzima se separó del soporte, tras alguno de estos tratamientos.

Posteriormente, se llevó a cabo un tratamiento similar con ciclohexano, disolvente orgánico que se utilizará posteriormente en reacciones de síntesis de ésteres. Se mantuvieron 300 mg de Lipozyme® IM20 en contacto con 10 ml de ciclohexano durante 72 h a 37 °C. Pasado este tiempo, se procedió a la extracción con 3x5 ml de agua destilada/desionizada, de la posible proteína que se hubiera desorbido y se llevó a cabo una cuantificación por el método del biuret de la cantidad de proteína en dicha fase acuosa.

III.3.5.- ELECTROFORESIS

Las electroforesis SDS-PAGE (dodecil sulfato sódico en gel de poliacrilamida) se realizaron siguiendo el sistema Laemmli²⁶². El gel separador era de un gradiente 10% y el gel concentrador de un 5 %. Las muestras se sometieron a condiciones reductoras tratandolas con β -mercaptoetanol.

III.4.- SEMIPURIFICACION DE LA LIPASA DE *Rh. miehei*.

En la presente Tesis Doctoral se llevó a cabo la semipurificación de la lipasa cruda de *Rhizomucor miehei*, para lo cual se emplearon dos tipos de metodologías:

- a).- basados en la separación de proteínas en función de su tamaño molecular (ultrafiltración y diálisis)

- b).- basados en la separación protéica por diferencias de solubilidad (precipitación con sulfato amónico)

III.4.1.- SEMIPURIFICACION DE ENZIMAS EN FUNCION DE SU PESO MOLECULAR.

Debido al elevado peso molecular de las proteínas, es posible la separación de moléculas de pequeño tamaño que puedan contaminarlas empleando métodos sencillos, los cuales también pueden ser utilizados para la resolución de mezclas de proteínas. Los métodos utilizados en la presente Tesis Doctoral, basados en este principio han sido la ultrafiltración, y la diálisis.

III.4.1.a.- Ultrafiltración

La ultrafiltración es un proceso de separación de proteínas de pequeño tamaño por filtración a través de una membrana semipermeable con un determinado tamaño de poro, con ayuda de la fuerza centrífuga y una corriente de nitrógeno, que puede ser aplicada en sentido paralelo al flujo o de forma tangencial²⁶⁴.

El aparato de ultrafiltración empleado fue un modelo UHP-43 de Micron Analytical, conectado a una corriente de nitrógeno y con agitación constante. Las membranas de ultrafiltración fueron membranas Diaflo modelo YM10 de Amicon, que dejan pasar a su través partículas de peso molecular inferior a 10 kD. La ultrafiltración se llevó a cabo en cámara fría a 4°C.

Procedimiento experimental

Se ultrafiltraron 25 ml de lipasa cruda de *Rh.miehei* (Lipozyme® 10000L). En el momento en que el volumen del residuo quedó por debajo de la hélice del aparato de ultrafiltración se dió por finalizado el proceso. Los líquidos ultrafiltrados se recogieron en una probeta, se midió su volumen y se determinó la concentración de proteínas por el método del biuret (ver III.3.1.a.).

Posteriormente, se restituyó el volumen de los líquidos de filtrado añadiendo al residuo la misma cantidad de agua y se volvió a ultrafiltrar. Este proceso se repitió catorce veces; la membrana se cambió tras la octava ultrafiltración.

III.4.1.b.- Diálisis

La diálisis es otro método de separación de proteínas en función de su tamaño molecular. En este caso se utiliza una membrana semipermeable de celofán con un tamaño de poro determinado, que retiene las sustancias de mayor peso molecular dejando pasar hacia el medio acuoso, en el que está sumergido la membrana, las partículas menores²⁶⁴.

Las membranas de diálisis empleados son de tamaño 2 (30 m x 14,3 mm) de Medicell International Ltd. (Londres, Reino Unido). Estas membranas dejan pasar a su través moléculas de peso molecular inferior a 12000-14000 daltons. El peso molecular de la lipasa cruda de *Rh.miehei* es de aproximadamente 30 kD²⁵⁰

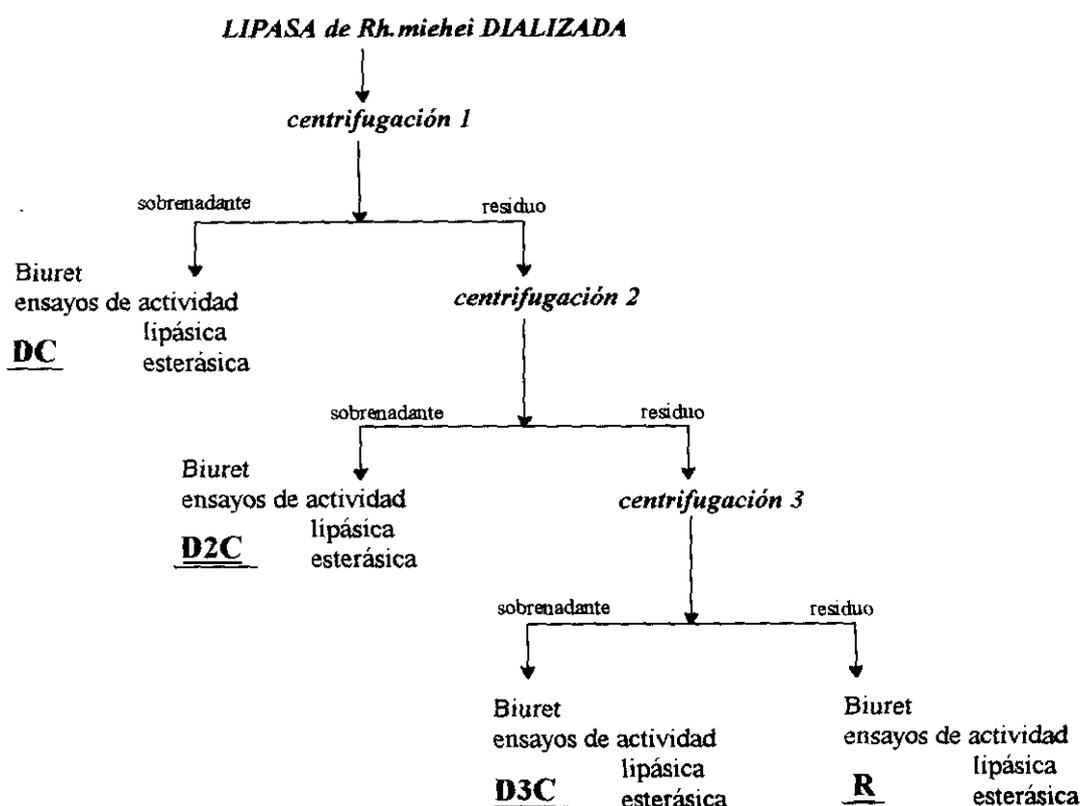
Procedimiento experimental

Debido al carácter fuertemente ácido de la lipasa de *Rh.miehei* las membranas de diálisis se rompían con facilidad. Por esta razón, para dializar 15 ml de lipasa cruda se utilizaron 3 membranas diferentes, con 5 ml de lipasa cada una. A continuación, se colocaron en un baño con 20 l de agua destilada/desionizada durante 48 h, renovando el agua del baño cada 24 h.

La lipasa dializada se dividió en dos lotes. Con uno de ellos, se hicieron ensayos de actividad esterásica (ver III.3.2.) y lipásica (siguiendo el método A de hidrólisis de aceite de oliva; ver III.3.3.a.) y se determinó la concentración de proteínas por el método del biuret (ver III.3.1.a.)

El otro lote se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante (denominado DC), se recogió y se determinaron sus actividades lipásica y esterásica; así como, su concentración de proteínas por el método del biuret. El residuo se diluyó en agua, para restituir el volumen inicial, y se volvió a centrifugar según las condiciones anteriores. Se recogió el nuevo sobrenadante (denominado D2C) y se llevaron acabo los ensayos anteriores; el residuo se diluyó en agua y se centrifugó de nuevo. A continuación, se hicieron los correspondientes ensayos tanto con el sobrenadante, denominado D3C; como con el residuo diluido en agua.

En el Esquema 22 se representa el proceso experimental seguido.



Esquema 22.: Esquema del método de semipurificación por diálisis y centrifugación..

III.4.2.- SEPARACION DE PROTEINAS POR DIFERENCIA DE SOLUBILIDAD

Las proteínas en disolución pueden sufrir profundas variaciones de su solubilidad en función del pH, la fuerza iónica, las propiedades dieléctricas del disolvente y la temperatura. Esta característica ha sido aprovechada para separar mezclas de proteínas, ya que cada una posee una composición en aminoácidos característica, la cual determina su comportamiento como electrolito.

En la presente Tesis Doctoral se utilizó un **método precipitación de proteínas por alteración de la fuerza iónica del medio, basado en la adición de sales neutras.**

Este es probablemente el método más empleado para llevar a cabo el fraccionamiento de proteínas por precipitación ya que presenta una serie de ventajas²⁶⁵:

- a).- es un método sencillo
- b).- el precipitado protéico obtenido no suele desnaturalizarse y su actividad se recupera tras redisolverlo.
- c).- la adición de sales neutras estabiliza la proteína frente a procesos de desnaturalización, proteólisis o contaminación microbiana.

La mayoría de los grupos hidrófobos de las cadenas laterales de los aminoácidos de las proteínas se colocan hacia el interior de la molécula. No obstante, algunos de ellos se disponen en la superficie formando una serie de agrupaciones hidrófobas, que no interaccionan con las moléculas de agua, ni con los grupos iónicos del medio. El grado de solubilidad de una determinada proteína está en función de la distribución de dichas agrupaciones hidrófobas superficiales y de su relación con las zonas hidrófilas de la proteína (Figura 29).

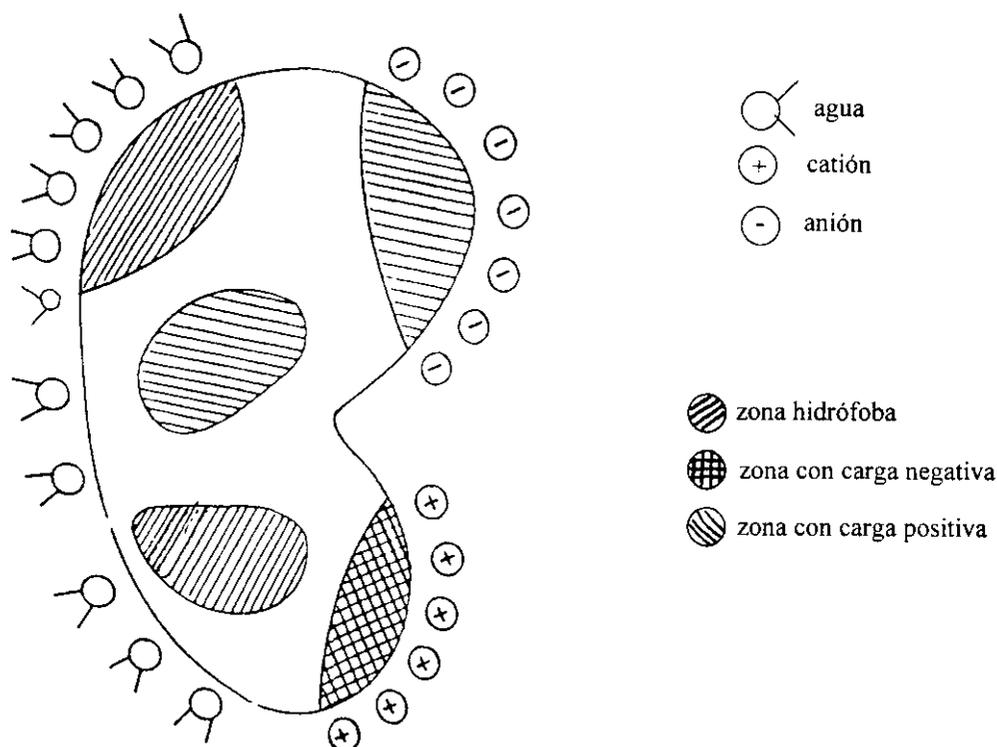


Figura 29: Representación esquemática de las áreas cargadas de la superficie de una proteína interactuando con los iones del medio. Las áreas hidrófobas superficiales de la proteína interactúan con moléculas de agua, las cuales forman una matriz ordenada alrededor de esas áreas.

Al añadir sales al sistema, los iones salinos son solvatados por moléculas de agua. Si la concentración de sales es muy elevada, las moléculas de agua que rodean a la proteína se desplazan para solvatar el exceso de iones del medio, dejando expuestos los agrupamientos hidrófobos de la superficie protéica. De esta forma, se produce la interacción entre los agrupamientos hidrófobos de distintas moléculas de proteína formando el correspondiente precipitado. Por tanto, las proteínas que presentan mayor cantidad de agrupamientos hidrófobos superficiales se agregarán más fácilmente. Los agregados formados son una mezcla de diferentes proteínas, por lo que la concentración de sal necesaria para lograr la precipitación dependerá de cada caso concreto. Además, dado que cada proteína tiene una composición de aminoácidos característica, su comportamiento frente a la adición de sales también será diferente. Por esta razón se deben preparar una serie de disoluciones saturadas

con distinta cantidad de la correspondiente sal, y así poder establecer la cantidad de sal necesaria para la proteína objeto de estudio.

III.4.2.a.- Factores a considerar

III.4.2.a.1.- Naturaleza de la sal utilizada.

Para determinar el tipo de sal adecuada para la semipurificación de proteínas por precipitación hay que analizar una serie de factores:

*** naturaleza del anión**

La efectividad de la sal empleada viene determinada principalmente por la naturaleza del anión. Los aniones multivalentes son los más efectivos por este orden:

fosfato > sulfato > acetato > cloruro

No obstante, dado que a pH neutro el ión fosfato se encuentra como mezcla de HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- , desde el punto de vista práctico el más adecuado es el anión sulfato.

*** naturaleza del catión**

Aunque tienen menos influencia en este método, también es un factor a considerar. Los cationes más adecuados son los monovalentes por este orden:

amonio > potasio > sodio

*** grado de solubilidad de la sal**

Este factor es importante, ya que se suelen emplear elevadas concentraciones salinas hasta lograr la precipitación de la proteína. Por esta razón las sales de potasio no son adecuadas debido a su escasa solubilidad en agua

*** densidad de la solución salina**

Es necesario considerar la densidad de la solución salina en relación con la densidad del agregado protéico, ya que la diferencia entre ambas densidades determinará la facilidad de la separación por centrifugación del agregado protéico de la masa líquida.

*** pureza química de la sal**

La sal utilizada debe presentar pocas impurezas y debe ser económica.

Teniendo en cuenta todos estos factores se eligió el **sulfato amónico como sal precipitante**, puesto que:

- * presenta un buen grado de solubilidad (una solución saturada en agua es aproximadamente 4M)
- * la pureza y el precio del sulfato amónico comercial son bastante aceptables.

El único inconveniente inherente a este método es que la proteína semipurificada contendrá cierta cantidad de sulfato amónico, por lo que no se deben utilizar métodos de cuantificación de proteínas, en los que pueda interferir el sulfato amónico. El método recomendado es el método de Bradford²⁶⁵.

III.4.2.a.2.- Cantidad de sal añadida al medio

Como se ha indicado anteriormente, cada proteína requiere una determinada cantidad de sal para precipitar. Por esta razón, es necesario preparar un gradiente de disoluciones enzimáticas con distinto grado de saturación de la sal. A continuación, es necesario analizar con que grado de saturación salina precipitan las proteínas de la disolución enzimática; así como determinar la concentración proteica y la actividad enzimática de cada uno de los precipitados obtenidos. De esta forma, se determina la cantidad de la correspondiente sal necesaria para obtener la proteína activa y en mayor concentración. La cantidad de sal añadida se expresa en porcentaje de saturación, asumiendo que el extracto protéico disuelve la misma cantidad de sulfato amónico que el agua pura. Así, para calcular los gramos de sulfato amónico que deben añadirse a un litro de agua a 20 °C para obtener una concentración determinada, se emplea la siguiente ecuación

$$g = \frac{533 (S_2 - S_1)}{100 - 0,3 S_2} \quad [27]$$

donde S_1 = concentración inicial y S_2 = concentración final.

III.4.2.a.3.- Temperatura del medio.

La temperatura a la cual se lleva a cabo la precipitación es muy importante, ya que al aumentar la temperatura, disminuye la solubilidad de las proteínas, por lo que la temperatura utilizada habitualmente es de 4°C.

III.4.2.c.- Procedimiento experimental

Como se indicó anteriormente, dado que cada proteína tiene una composición de aminoácidos característica, su comportamiento frente a la adición de sales también será diferente. Por esta razón se prepararon una serie de disoluciones con distinto grado de saturación de sulfato amónico, para así poder establecer la cantidad de sal adecuada para precipitar la lipasa de *Rh.miehei*.

Previamente se pulverizó el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con ayuda de un mortero y se preparó una disolución 1/10 de lipasa de *Rh.miehei* en tampón Tris-HCl (50 mM) pH=7,5. A continuación, se tomaron 7 muestras de 25 ml cada una y se les adicionó poco a poco una cantidad variable de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, para obtener un gradiente de disoluciones saturadas. En la Tabla 12 aparece la cantidad de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ añadido en cada caso y el grado de saturación alcanzado²⁶⁵.

Tabla 12: Cantidad de sulfato amónico añadido a la disolución enzimática para obtener distintos grados de saturación salina.

% saturación	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g)
20	2,67
30	4,15
40	5,72
50	7,37
60	9,15
70	11,05
80	13,07

Cada disolución se agitó durante 1h a 4 °C. Posteriormente, se centrifugaron a 5000 r.p.m. a 4 °C durante 40 min.

En las disoluciones al 20, 30 y 40 % de saturación no apareció ningún precipitado; por

tanto, con ellas no se continuó el proceso.

El sobrenadante de las disoluciones al 50, 60, 70 y 80 % de saturación, en las que sí hubo precipitación, se retiró y el residuo se diluyó en 10 ml de tampón Tris-HCl (50 mM) pH=8,0. A continuación, cada residuo diluido se dividió en dos lotes (A y B).

Con los lotes (A) se hicieron ensayos de actividad esterásica (*ver III.3.2.*) y lipásica (siguiendo el método A de hidrólisis de aceite de oliva; *ver III.3.3.a.*). Asimismo, se determinó su concentración de proteínas por el método de Bradford (*ver III.3.1.b.*) ya que con el método del biuret podían existir interferencias entre los grupos amonio de la proteína y los del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al reaccionar éstos con las sales de cobre del reactivo de biuret²⁶⁵.

Los lotes B se dializaron con una membrana de diálisis de 30 m x 14,3 mm y se liofilizaron. Posteriormente, se realizaron también ensayos de actividad lipásica y esterásica y se determinó su concentración de proteínas por el método de Bradford.

III.5.- INMOVILIZACION DE LA LIPASA DE *Rhizomucor miehei*.

En la presente Tesis Doctoral se llevó a cabo la inmovilización de la lipasa de *Rhizomucor miehei* por unión covalente con sílice, previamente activada vía 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (TCT) (ver II.4.6.).

Como ya se indicó en la Introducción, los procesos de inmovilización por enlace covalente se desarrollan en dos etapas, ya que el proceso de activación del soporte se lleva a cabo en condiciones drásticas, que pueden alterar la estabilidad de la enzima. Las dos fases del proceso son:

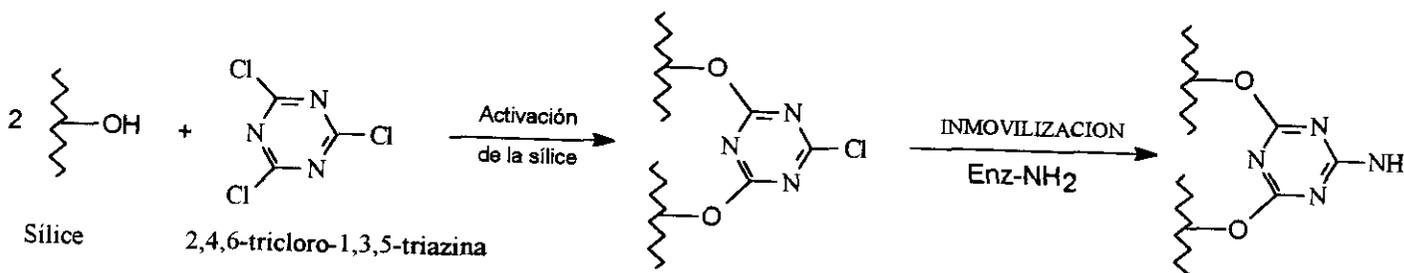
- a) activación de la sílice vía 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (TCT)
- b) inmovilización de la enzima sobre sílice activada

La sílice utilizada fue Kieselgel 40 de Merck, que presenta las siguientes características texturales:

- diámetro de partícula: 0,063-0,2 mm
- superficie específica: 239 m²/g
- diámetro medio de poro: 9,5 Å
- volumen de poro acumulado: 0,57 cm³/g

III.5.1.- ACTIVACION DEL SOPORTE

La activación del soporte, sílice en este caso, se realizó por reacción con 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (TCT) (Esquema 23). La optimización de esta metodología fue llevada a cabo por miembros de nuestro grupo de trabajo²⁶⁶



Esquema 23: Activación de la sílice con 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (TCT)

En un matraz se añadieron 25 g de Sílice, 250 ml de tolueno seco, 7,5 g de 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina y 15 ml de N,N,N-trietilamina. La mezcla se mantuvo a reflujo a 60 °C

durante 4h. A continuación, se procedió al lavado del soporte, para lo cual la sílice activada se filtró a vacío con un embudo Buchner y se lavó con 250 ml de tolueno seco y con acetona previamente pura hasta que la sílice se decoloró.

III.5.1.a.- Medida del grado de activación

El grado de activación de la sílice se midió en función del tanto por ciento de TCT unida, para lo cual se hizo una determinación de cloruros tanto del soporte activado como en los líquidos de lavado siguiendo el método de Mohr²⁶⁷

Para la valoración de los cloruros de los líquidos de filtrado se tomaron 5 ml de dichos líquidos, se añadieron 10 ml de NaOH (0,1 M) y la mezcla se agitó durante 5 min. A continuación, se separaron ambas fases en una ampolla de decantación y se repitió el proceso dos veces más. Posteriormente, se unieron las tres fases acuosas, de las cuales se tomó 1 ml, que se mezcló con tampón fosfato/NaOH (0.1 M) pH= 7,0 y con 0.05 g de K₂CrO₄, valorándose la mezcla con una disolución de AgNO₃ (0,1M), hasta la formación de un precipitado rojo de Ag₂Cr₂O₄.

Para la valoración de los átomos de cloro remanentes en el soporte activado se tomaron 0,1 g de éste y se tuvieron en agitación, durante 2 h a temperatura ambiente, con 10 ml de NaOH (0,1 M). A continuación, se tomó 1 ml de la disolución y se valoraron los inoes cloruro de forma análoga al caso anterior. En los dos casos se hicieron ensayos en blanco para determinar la posible existencia de cloruros en el disolvente orgánico, solución de NaOH, tampón, etc.

III.5.2.- INMOVILIZACION DE LA LIPASA DE *Rhizomucor miehei*

En la presente Tesis Doctoral se inmovilizaron la lipasa de *Rh.miehei* cruda (Lipozyme® 10000L) y semipurificada por precipitación con un 50% de saturación de sulfato amónico, ya que éste fue el proceso de semipurificación con el que se obtuvieron mejores resultados. El procedimiento seguido con ambas enzimas fue el mismo.

Procedimiento experimental

Se preparó una disolución (5,16 mg proteína/ml) de lipasa cruda de *Rh.miehei* en tampón Tris-HCl (0,1M) pH= 8,0. En el caso de la lipasa semipurificada el precipitado

obtenido se disolvió en el mismo tampón.

11 g de sílice activada y 100 ml de la disolución de lipasa se agitaron, durante 49 h a 4 °C. A continuación, se filtró a vacío con un embudo buchner y el residuo se lavó con tampón Tris-HCl (0,1M) pH= 8,0 hasta que los líquidos de lavado dieron negativo el ensayo del Biuret, es decir, hasta que no hubo proteínas en los líquidos de lavado.

III.5.2.a.- Determinación de la carga protéica del derivado

La carga protéica del derivado inmovilizado se determinó por diferencia entre el contenido protéico de la disolución enzimática inicial y los líquidos de lavado. El método de determinación protéica utilizado fue el método del biuret (*ver III.3.1.a.*)

III.5.2.b.- Determinación de la actividad retenida del derivado

Para calcular el porcentaje de actividad retenida se hizo un ensayo estándar de actividad lipásica con tributirina (*ver III.3.3.b.*) a la disolución enzimática inicial y al derivado inmovilizado. La actividad lipásica, obtenida en cada ensayo, se expresó por miligramo de proteína con fines comparativos. La concentración protéica de la disolución enzimática inicial se determinó por el método del Biuret y la concentración protéica del derivado inmovilizado se determinó en función de la carga enzimática calculada anteriormente.

III.5.3.- ESTUDIOS DE ESTABILIDAD TÉRMICA DE LOS DERIVADOS INMOVILIZADOS.

Para estudiar la estabilidad térmica de los derivados inmovilizados obtenidos, frente a la enzima cruda y semipurificada de *Rh.miehei*, se almacenaron tanto los derivados como las enzimas a 37 y 50 °C. A continuación, se analizó la actividad lipásica de cada uno de ellos, tras un determinado tiempo de almacenaje, haciendo ensayos de hidrólisis de tributirina (*ver III.3.3.b.*)

Procedimiento experimental

El medio utilizado para almacenar las enzimas presentaba la misma composición de sales inorgánicas que el emulsificante en el que se preparó el sustrato de la reacción de hidrólisis de tributirina, es decir 1,8 g de NaCl y 0,041g de KH_2PO_4 , completando con agua

hasta 100ml.

Las lipasas cruda y semipurificada de *Rh.miehei* se diluyeron en el medio de almacenaje y se mantuvieron a 50 y 37 °C, analizando su actividad lipásica cada cierto tiempo.

Para analizar la estabilidad de los derivados inmovilizados se prepararon pequeñas muestras (2 por cada tiempo estudiado) con 50 mg de derivado y 0,2 ml del medio de almacenaje. Estas muestras se almacenaron a 50 y 37 °C de temperatura durante un determinado tiempo, tras el cual se analizó su actividad lipásica remanente.

III.5.3.a.- Ajuste estadístico de las curva de termoestabilidad obtenidas.

La actividad lipásica obtenida tras un determinado tiempo de almacenaje a 37 y 50 °C de cada enzima se expresó en porcentaje de actividad retenida. Los resultados obtenidos se representaron frente al tiempo de almacenaje (horas) y las curvas de desactivación obtenidas se ajustaron a un modelo exponencial decreciente con ayuda del programa EXFIT del paquete integrado SIMFIT, versión 4.0 ²⁵⁴.

III.6.- SINTESIS QUIMICA DE ESTERES BUTILICOS DE ACIDOS (R,S) 2-ARILPROPIONICOS.

Para la resolución enantioselectiva de los antiinflamatorios no esteroídicos derivados del ácido (R,S) 2-arilpropiónico, se planteó una metodología basada en la hidrólisis enantioselectiva de los ésteres butílicos de dichos ácidos. Para poder llevar a cabo esta hidrólisis se sintetizaron, por vía química, los correspondientes ésteres siguiendo la metodología descrita a continuación.

Los sustratos de partida fueron las mezclas racémicas de los ácidos:

(R,S) 2-(4-isobutilfenil)propiónico (**Ibuprofeno**)

(R,S) 2-fenilpropiónico

(R,S) 2-(3-benzoilfenil)propiónico (**Ketoprofeno**).

(S) 2-(6-metoxi-2-naftil)propiónico (**Naproxeno**) y (R) 2-(6-metoxi-2-naftil)propiónico

Los espectros de **resonancia magnética nuclear de protón** ($^1\text{H-RMN}$) se registraron en un aparato Bruker, modelo 250. Como referencia interna se utilizó tetrametilsilano (TMS). Los datos de los desplazamientos químicos se expresaron en δ (ppm). Para la interpretación de primer orden se emplearon las siguientes abreviaturas: singlete (s), doblete (d), triplete (t), cuadruplete (c) y multiplete (m).

Los **análisis elementales cuantitativos** fueron realizados en el Servicio de Microanálisis de la Universidad Complutense. El analizador utilizado es un modelo 2400-CHN de Perkin-Elmer.

Los **espectros infrarrojo** (IR) se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 283, utilizando película de poliestireno para la calibración del aparato.

III.6.1.- (R,S) 2-(4-isobutilfenil)propionato de butilo.

(R,S) éster butílico del Ibuprofeno.

Se disolvieron 10 g de ácido (R,S) 2-(4-isobutilfenil)propiónico (Ibuprofeno) en 40 ml de 1-butanol y se añadieron unas gotas de H_2SO_4 para acidificar el medio. La mezcla se mantuvo a reflujo durante 18 h. A continuación, se siguió un procedimiento analítico de extracción para separar el ácido y el éster. Para ello, se añadieron 20 ml de agua y 20 ml de

acetato de etilo. La mezcla se agitó bien y se separaron dos fases (acuosa y orgánica) en una ampolla de decantación; la fase acuosa se volvió extraer dos veces más con acetato de etilo. Posteriormente, se reunieron las tres fases acuosas y se les añadió 20 ml de NaOH (0,5 M), para formar la sal sódica del ácido y de esta forma separarla del éster que quedó en la fase orgánica; tras separar estas dos fases, la orgánica se trató dos veces más con la disolución de NaOH (0,5M). Se juntaron las tres fases orgánicas que contienen el éster butílico y se desecó con CaCl₂ anhidro, el cual se retiró posteriormente por filtración. Finalmente, se eliminó el acetato de etilo por evaporación.

Rendimiento: 88 % en producto aislado.

¹H-RMN (CDCl₃, 250 MHz): δ= 7,3-7,0 (m,4H); 4,1 (t, 2H); 3,7 (c, 1H); 2,45 (d, 2H); 1,4 (m, 1H); 1,5 (d, 3H); 1,3 (m, 4H); 0,9 (t, 3H); 0,85 (t, 6H)

IR (film)(ν cm⁻¹): 3040, 2957, 1732, 1626, 1165.

Análisis elemental:

calculado para C₁₁H₁₆O₂: C= 77,82 % , H= 9,99 %

encontrado: C= 77,00 % , H= 9,70 %

III.6.2.- (R,S) éster 2-fenilpropionato de butilo.

Se partió de 5 g del correspondiente ácido disuelto en 50 ml de butanol. A la mezcla se le añadió, gota a gota, 5,09 ml de SO₂Cl (relación molar 1:2) y se dejó a reflujo durante una noche. Posteriormente se concentró en rotavapor la solución hasta la mitad de su volumen aproximadamente y se le adicionó Cl₃CH saturado de amoníaco (110 ml). Finalmente se filtró el NH₄Cl formado y se concentró la solución de cloroformo. Para purificar el producto se columnó en sílica gel utilizando n-hexano/acetato de etilo (13/3) como eluyente.

Rendimiento: 86 % en producto aislado

¹H-RMN (CDCl₃, 250 MHz): δ= 7,4-7,2 (m, 5H); 4,15 (t,2H); 3,7 (c, 1H); 1,5 (d, 3H); 1,3 (m, 4H); 0,9 (t, 3H)

IR (film)(ν cm⁻¹): 3070, 3040, 2970, 1740.

Análisis elemental:

calculado para C₁₁H₁₆O₂: C= 75,69 % , H= 8,80 %

encontrado: C= 75,52 % , H= 8,67 %

III.6.3.- (R,S) 2-(6-metoxi-2-naftil)propionato de butilo.

La metodología de esterificación seguida fue igual que en el caso del 2-fenilpropionato de butilo. Sin embargo, la purificación se llevó a cabo mediante un proceso de recristalización en hexano seco caliente (a reflujo) dejando que se enfríe lentamente a temperatura ambiente durante una noche.

Rendimiento: 83 % en producto aislado

¹H-RMN (CDCl₃, 250 MHz): δ= 7,1-7,7 (m, 6H); 4,1 (t, 2H); 3,9 (s, 3H); 3,85 (m, 1H); 1,6 (d, 3H); 1,3 (c, 4H); 0,9 (t, 3H)

IR (film)(ν cm⁻¹): 3055, 2953, 1724, 1607

Análisis elemental:

calculado para C₁₈H₂₀O₂: C= 79,96 % , H= 8,20 %

encontrado: C= 80,00 % , H= 7,90 %

III.6.4.- (R,S) 2-(3-benzoilfenil)propionato de butilo

(R,S) éster butílico de Ketoprofeno.

La metodología empleada fue la misma que en el caso del 2-fenilpropionato de butilo. La purificación también se realizó por columna rellena de sílica gel utilizando diclorometano como eluyente.

Rendimiento: 87 % en producto aislado

¹H-RMN (CDCl₃, 250 MHz): δ= 7,4-7,9 (m, 9H); 4,1 (t, 2H); 3,85 (c, 1H); 1,6 (d, 3H); 1,3 (m, 4H); 0,9 (d, 3H).

IR (film)(ν cm⁻¹): 3061, 2960, 1760, 1732, 1597.

Análisis elemental:

calculado para C₂₂H₂₂O₂: C= 81,60 % , H= 7,53 %

encontrado: C= 81,40 % , H= 7,39 %

III.7.- HIDROLISIS ENZIMATICA DE ESTERES

En estas reacciones de hidrólisis de ésteres se emplearon dos metodologías debido a la difícil reproducibilidad en la obtención de la emulsión de los ésteres butílicos de los ácidos (R,S) 2-arilpropiónicos y a la necesidad de extraer el producto de la reacción, ya que en las técnicas analíticas empleadas no se pueden utilizar muestras acuosas.

La diferencia entre los dos métodos solo se basa en el procedimiento experimental, ya que los sustratos, tampón de trabajo, lipasas y proceso de extracción final son semejantes.

En el Método A se dividió el volumen total de reactivos en diferentes alícuotas de 3 ml cada una, que se pararon a distintos tiempos de reacción. Por el contrario, en el Método B se trabajó a mayor volumen (10 ml) a un tiempo fijo para todas (143 h).

En el **Método A**, aunque se obtienen varios valores de rendimiento para cada reacción, los resultados son poco reproducibles, debido al difícil manejo del crudo de reacción durante la extracción y a la dificultad de reproducir las condiciones de la emulsión. En el **Método B** solo se obtiene un valor de conversión para cada reacción. Sin embargo, la manipulación de la reacción durante el proceso de extracción fue mucho más sencillo y la reproducibilidad alcanzada mucho mejor; por todo ello, éste fue el método elegido para estudiar las reacciones de hidrólisis de ésteres de ácidos (R,S) 2-arilpropiónicos.

III.7.1.- METODO A

Procedimiento experimental

Cada tipo de reacción se realizó por triplicado, poniendo en cada tubo de ensayo el éster correspondiente (0,125M) y 3 ml de tampón Tris-HCl de diferente pH, según la reacción. El contenido de cada tubo se sonicó a 20 wátios en un cañón de ultrasonidos Branson modelo Sonifier 450 durante 2 min hasta obtener una emulsión homogénea; se añadió la lipasa cruda (Lipozyme® 10000L)(0,4 ml) o inmovilizada (Lipozyme® IM20) (300 mg) y se colocaron los tubos en un baño de agua termostático a 37 °C. Cada reacción se paró a un determinado tiempo de reacción; se extrajeron el éster remanente y el ácido hidrolizado siguiendo un procedimiento analítico de separación (*ver III.7.3.*); se analizaron en un cromatógrafo de gases (*ver III.8.3.a.*) para determinar el rendimiento de la reacción y posteriormente se analizaron en un HPLC con columna quiral (*ver III.8.3.b.*) para determinar el exceso enantiomérico del

ácido hidrolizado.

III.7.2.- METODO B

Procedimiento experimental.

Cada reacción se llevó a cabo solo una vez pero el volumen de reacción fue mayor y todas las reacciones se detuvieron a un tiempo fijo de 143 h. Se eligió ese tiempo fijo de reacción porque el rendimiento de la reacción estándar (hidrólisis del éster butílico de (R,S) Ibuprofeno (0,125 M) en tampón Tris-HCl (0,1 M) pH= 7,0) era aproximadamente del 50 %.

En un reactor de 25 ml se añadió el éster correspondiente en una concentración 0,125 M y 10 ml de tampón Tris-HCl (0,1 M) de diferente pH, según la reacción. A continuación, se sonicó a 20 watos en un cañón de ultrasonidos Branson modelo Sonifier 450 durante 2 min; cuando la emulsión estuvo bien formada (aspecto homogéneo, blanquecino y sin coágulos), se adicionó la lipasa cruda (0,4 ml) o inmovilizada (300 mg), según el caso. La reacción se dejó transcurrir durante 143 h en un baño termostatzado a 37 °C. El proceso seguido a continuación (extracción, análisis del rendimiento de la reacción y exceso enantiomérico del ácido hidrolizado) es el mismo que en el Método A.

III.7.3.- AISLAMIENTO DEL PRODUCTO DE REACCION

El medio de reacción se filtró con un filtro de pliegues, para eliminar la lipasa (en el caso de la lipasa cruda este procedimiento fue bastante dificultoso, debido a la consistencia viscosa de la enzima). A continuación, se añadieron unas gotas de H₂SO₄, para acidificar el medio, y se añadieron 20 ml de éter etílico y 10 ml de agua, para tener volúmenes semejantes en las dos fases; se agitó durante algunos minutos y en una ampolla de decantación se separaron la fase orgánica y la fase acuosa. La fase acuosa se volvió a extraer, dos veces más, con 20 ml de éter etílico. Finalmente, se unieron las tres fases orgánicas, en las que están diluidos el éster y el ácido; se desecaron añadiendo una punta de espátula de CaCl₂ anhidro, que posteriormente se eliminó por filtración con un filtro de pliegues. El éter etílico se eliminó por evaporación y el residuo seco se diluyó en hexano (para el Ibuprofeno y ácido 2-fenilpropiónico) o en éter diisopropílico (para el Naproxeno y Ketoprofeno). De esta forma el ácido hidrolizado y el éster remanente se encuentran en medio orgánico, preparados para ser analizados en el cromatógrafo de gases y en el HPLC con columna quiral.

III.8.- SINTESIS ENZIMATICA DE ESTERES

Uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral es el estudio del comportamiento de la lipasa de *Rh.miehei* en medio orgánico como catalizador de la reacción de síntesis enantioselectiva de ésteres de antiinflamatorios no esteroideos derivados del ácido 2-arilpropiónico (AINEs).

Este estudio lo hemos dividido en dos secciones, según sean los factores objeto de estudio:

1) estudio de las variables continuas o estructurales (disolvente y sustratos (ácidos y alcoholes)

2) estudio de las variables discontinuas o de operación (temperatura, volumen de reacción, velocidad de agitación, tiempo de reacción, cantidad de catalizador, etc.), empleando la metodología del Diseño estadístico de Experimentos

III.8.1.- ESTUDIO DE LAS VARIABLES CONTINUAS O ESTRUCTURALES.

III.8.1.a.- Reacción estándar

* *ácido*: Ibuprofeno (0,125 M)

* *alcohol*: 1-butanol (0,125 M)

* *disolvente*: ciclohexano (10 ml)

* *temperatura* = 37 °C

* *tiempo de reacción* = 72 h

* *enzima*: lipasa cruda (Lipozyme® 10000L) (0,4 ml)

lipasa inmovilizada (Lipozyme® IM20) (300 mg)

Procedimiento experimental

Para estudiar la influencia de la naturaleza de los sustratos (ácidos (R,S) 2-arilpropiónicos y alcoholes) y disolventes se definió una reacción estándar, en la cual se fueron modificando esas variables estructurales, para determinar cuales son las condiciones óptimas para la actuación de la lipasa de *Rh.miehei* en estas reacciones. Este tipo de

cada vez).

En un reactor de 25 ml se añadieron los sustratos (ácido y alcohol) y el disolvente. A continuación, dicho reactor, se colocó en un baño termostático a 37 °C con agitación constante. Se dejó transcurrir la reacción y cada cierto tiempo se tomaron alícuotas de 0,1 ml, las cuales se diluyeron en 1,4 ml del disolvente empleado. Estas muestras se filtraron con microfiltros de nylon de 0,2 µm de la casa Lida.

III.8.2.- ESTUDIO DE LAS VARIABLES DE OPERACION

(Diseño estadístico de Experimentos).

Para el estudio de las variables continuas o de operación, que pueden influir en las reacciones de síntesis de ésteres, no se utilizaron los ensayos O.V.A.T., empleados en el análisis estructural de la reacción, sino que se utilizó un método de variación múltiple mediante la aplicación de un análisis factorial denominado Diseño estadístico de Experimentos, ya que este método permite determinar con mayor certeza que variables son las que más influyen en el proceso y si hay algún tipo de influencia conjunta de las variables estudiadas.

En el Diseño estadístico de Experimentos todos los parámetros objeto de estudio varían simultáneamente de forma programada, desarrollándose un estudio eficaz y racional de las variables elegidas en todo su intervalo y obteniéndose información adicional acerca de los efectos debidos al conjunto de dos o más variables²⁶⁸.

En la presente Tesis se ha aplicado esta metodología al estudio de la reacción de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno en isooctano a 37 °C. Este estudio se aplicó a la lipasa cruda (Lipozyme® 10000L) e inmovilizada (Lipozyme® IM20) de *Rh.miehei*. La reacción con los valores medios de cada variable se realizó por triplicado con cada enzima, hasta alcanzar un rendimiento aproximado del 50 %, el cual se logró a las 8h con la lipasa cruda y a las 24 h con la lipasa inmovilizada. El procedimiento seguido para cuantificar el rendimiento de la reacción se indica en la sección siguiente (*ver III.8.3.a.*). El exceso enantiomérico de estas reacciones no se determinó, ya que la finalidad de este estudio era solo conocer la influencia de estas variables en la actividad catalítica de estas lipasa.

El número total de experimentos fue de 19, de los cuales 16 constituyeron el análisis factorial en sí (combinación de las variables en sus niveles máximo y mínimo), y tres

(correspondientes al punto central de cada variable) permitieron un análisis estadístico del diseño y el cálculo de los límites de confianza del estudio. Los valores máximos y mínimos de estas variables se combinaron de forma aleatoria usando el programa STATGRAPH²⁶⁹

La variación del rendimiento de la reacción, determinada por cromatografía gaseosa (ver III.8.3.a.), se expresó como una función polinómica de las seis variables objeto de estudio (ecuación 28):

$$Y (\%) = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ij} x_i x_j \quad [28]$$

III.8.3.- METODOS DE CUANTIFICACION DE LAS REACCIONES

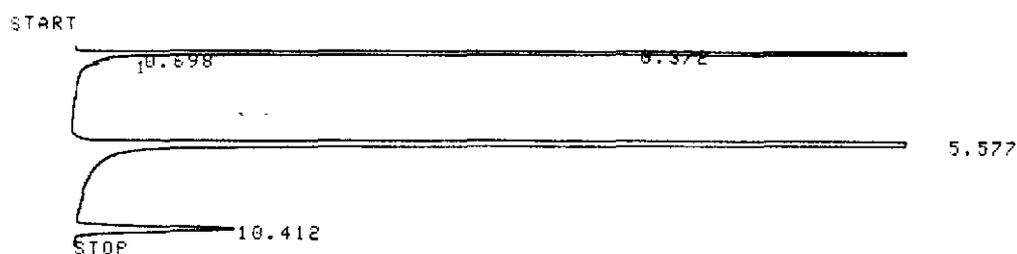
III.8.3.a.- Determinación del rendimiento de la reacción

El rendimiento total de la reacción se midió con un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-14A equipado con un detector de ionización de llama, un inyector de split (1:2) y una columna SPB-1 sulfur (15 m x 0,32 mm). El gas transportador empleado fue nitrógeno, la temperatura del inyector fue de 300 °C, la temperatura del detector fue 350 °C. La temperatura de la columna y el flujo del gas transportador variaron en función del ácido analizado, como se recoge en la Tabla 13.

Tabla 13: Condiciones de análisis del rendimiento de reacción por cromatografía gaseosa.

ACIDO	T°columna	flujo de N₂	tr (ácido)	tr (éster)
Ibuprofeno	180 °C	12 ml/min	6 min	10 min
Naproxeno	190 °C	30 ml/min	10 min	17 min
Ketoprofeno	190 °C	30 ml/min	16 min	25 min
2fenilpropioni	180 °C	3 ml/min	3 min	5 min

tr = tiempo retención



PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	0.372	10739952	S	E	80.1009	
2	5.577	2538156			18.9301	
3	10.412	129914			0.9689	
TOTAL		13408021			100	

Figura 30: Cromatograma obtenido tras el análisis por cromatografía gaseosa de una reacción de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno, catalizada por la lipasa de *Rh.miehei*.

A partir de los datos suministrados por los cromatogramas se calculó la conversión en éster a través de dos métodos cuantitativos, ambos coincidentes:

III.8.3.a.1.- Método de la calibración absoluta o del estándar externo.

Este método indirecto consiste en utilizar un estándar externo, para lo cual se debe disponer de mezclas sintéticas cuyas concentraciones de analito (Ibuprofeno) sean conocidas con precisión. Se preparó una curva de calibrado directa (área frente a concentración de analito) a partir de los cromatogramas correspondientes obtenidos inyectando el mismo volumen (0,2 µl) de mezcla sintética en cada caso. Cuando se inyecta igual volumen de la mezcla problema procedente del medio de reacción, el área obtenida se correlaciona directamente con la cantidad de ácido remanente a través de la curva de calibrado.

$$\text{área} = (4,1 \pm 0,1)10E+5 [\text{ácido (M)}] + (2,3 \pm 0,1)10E+4$$

$N = 11$ $R = 0,99$
 $t_{1,9(\alpha=0,05)} = 1,83$ $t_{\text{exp}} = 46,3$
 $F_{\text{SND}1,9(\alpha=0,05)} = 3,34$ $F_{\text{SNDexp}} = 2144$

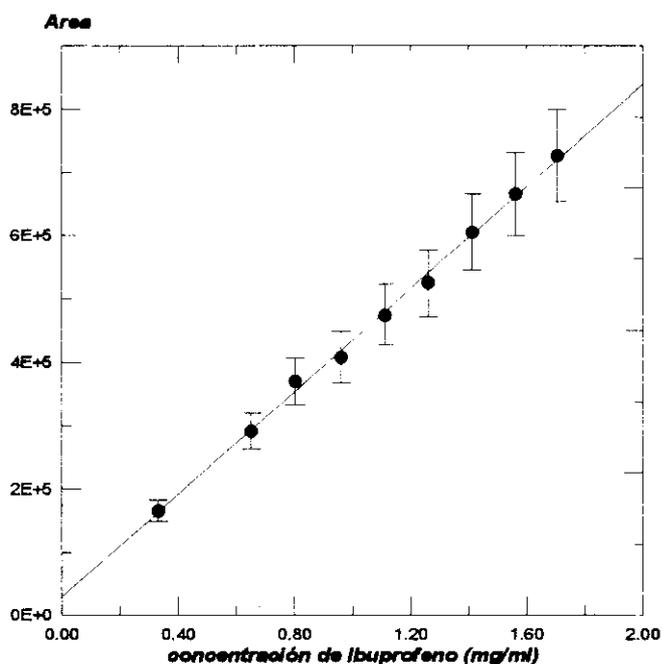


Figura 31: Recta de calibrado por cromatografía gaseosa para el Ibuprofeno.

III.8.3.a.2.- Método directo o de normalización de áreas.

En este método se considera que la suma de las áreas de todos los picos corresponde al 100 % de los solutos separados y, por tanto, el área del soluto A será el porcentaje en peso del mismo en la muestra. Para poder aplicar este método es necesario que todos los componentes de la muestra se eluyan de la columna y que el detector presente igual sensibilidad para todos ellos, dando respuestas lineales y reproducibles. Esta condición sólo se cumple cuando se trata de series homólogas de solutos de alto poder de ebullición. En el caso de la separación del Ibuprofeno y su éster butílico se cumplen estos requisitos. Además, se comprobó la validez del método por comparación con el método cuantitativo del patrón externo. Este fue, por tanto, el método elegido para calcular el rendimiento de las reacciones enzimáticas tanto de síntesis como de hidrólisis realizadas a lo largo de la presente Tesis Doctoral debido a su mayor simplicidad.

III.8.3.b.- Determinación del exceso enantiomérico del ácido remanente.

El exceso enantiomérico del ácido remanente, en las reacciones de síntesis enzimática de ésteres se determinó mediante HPLC (Waters-Millipore, modelo 590) dotado con una columna quiral (Chiracel®-OD; de Daicel Chemical Industries Ltd.; Tokio, Japón) de carbamato de celulosa (25cm x 0,46cm), capaz de separar los enantiómeros R y S de los ácidos 2-arilpropiónicos.

Los componentes de la fase móvil se modificaron en función del ácido analizado (Tabla 14), pero en todos los casos el flujo de dicha fase móvil fue de 0,8 ml/min, la presión fue de 200 psi y la longitud de onda empleada para la determinación espectrofotométrica de estos compuestos fue de 254 nm.

Las muestras de Ketoprofeno fueron analizadas con una columna quiral (Chiralcel®-OJ; de Daicel Chemical Ind.) de éster de celulosa (25cm x 0.46cm). El flujo de la fase móvil fue de 1 ml/min, la presión fue de 780 psi y la longitud de onda fue también de 254 nm.

Tabla 14: Características de la fase móvil utilizada para determinar el exceso enantiomérico de las reacciones emzimáticas de síntesis de ésteres.

ACIDO	fase móvil
Ibuprofeno	hexano / 2-propanol / ac.trifluoroacetico (100/1/0,1) (v/v/v)
Naproxeno	hexano / 2-propanol / ac.acético (97/3/1) (v/v/v)
Ketoprofeno	hexano / 2-propanol/ ac.acético (90/10/1) (v/v/v)
2-fenilpropionico	hexano / 2-propanol / ac. fórmico (98/2/1) (v/v/v)

Los tiempos de retención de los enantiómeros R y S de cada ácido fueron los siguientes:

Ibuprofeno → (R) 19 min; (S) 22 min

Naproxeno → (R) 22 min; (S) 24 min

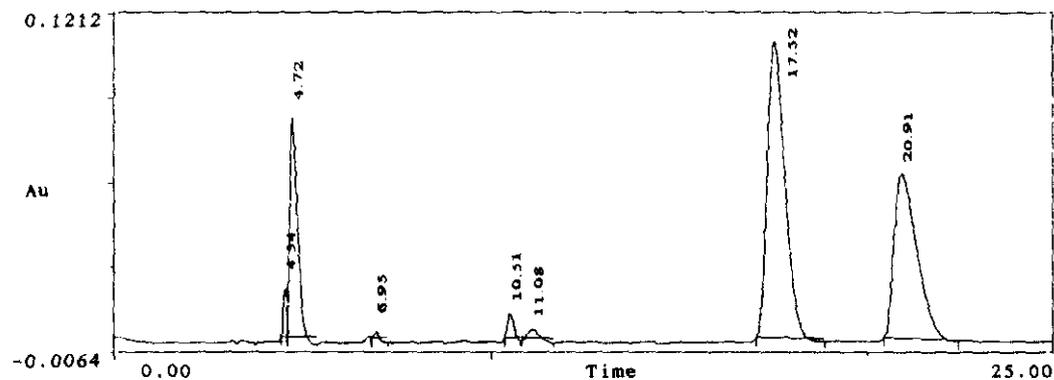
Ketoprofeno → (R) 20 min; (S) 25 min

ácido 2-fenilpropiónico → (R) 22 min; (S) 24 min

```

c:\lctalk\data\
Vial Number
Injection Number
Wavelength      254 nm
Current
c:\lctalk\method\
C:\LCTALK\SEQUENCE\

Vial name
Initial Pressure
2 samples per sec
Original
c:\lctalk\method\
C:\LCTALK\SEQUENCE\
    
```



Retent	Peak Name	area	% Area	height	% Height
4.54		136660	1.557	210849	6.374
4.72		1303452	14.852	943315	28.517
6.95		18299	0.209	26758	0.809
10.51		111041	1.265	102987	3.113
11.08		58998	0.672	36218	1.095
17.52		4164903	47.457	1275698	38.565
20.91		2982798	33.988	712075	21.527

Figura 32: Cromatograma obtenido tras el análisis por HPLC con columna quiral de una reacción de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno, catalizada por la lipasa de *Rh.miehei*.

III.9.- ISOTERMAS DE ADSORCION

Las isotermas de adsorción son una representación gráfica de la variación de la actividad de agua (a_w) respecto a la cantidad de agua añadida al medio en el que se encuentra la enzima (en este caso la célula del aparato) (ver II.2.6.c.)

La medida de actividad de agua se realizó en un medidor modelo Rotronic Hygroscop D.T. de la casa Aname, especial para disolventes orgánicos, que permitió la lectura simultánea de humedad y temperatura, la cual se fijó a $(25 \pm 0,5)$ °C aproximadamente, mediante un baño termostatzado acoplado a una célula de medidas.

III.9.1.- CALIBRACION DEL APARATO DE ACTIVIDAD DE AGUA (a_w)

La calibración se llevó a cabo, en primer lugar, con el patrón de menor a_w (sal-11; $a_w=0,1$) y, posteriormente, con el patrón de mayor a_w (sal-98; $a_w=0,9$) (ver III.1.5.)

III.9.2.- PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Las muestras objeto de estudio deben ser desecadas totalmente antes de comenzar una isoterma. En este caso para desecar las enzimas se han empleado dos metodologías diferentes en función del estado físico de éstas, ya que la lipasa cruda de *Rh.miehei* (Lipozyme 10000L) es un líquido, mientras que el derivado inmovilizado (Lipozyme® IM20) es un sólido.

Lipasa cruda de *Rh. miehei* (Lipozyme® 10000L)

Para desecar esta lipasa se congeló previamente a $-180\text{ }^\circ\text{C}$ utilizando nitrógeno líquido, ya que debido al alto contenido en azúcares de la preparación enzimática, no se pudo congelar con los métodos convencionales. A continuación, se liofilizó y posteriormente se desecó colocándola en atmósfera de P_2O_5 anhídrido, conectado a una bomba de vacío. Para verificar el total secado de la enzima se midió el valor de a_w , en el detector de actividad de agua; dicho valor debe oscilar entre 0,005 y 0,01.

Lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* (Lipozyme® IM20)

Para desecar la lipasa inmovilizada por Novo-Nordisk (Lipozyme® IM20) se colocó una determinada cantidad de enzima en un desecador con P_2O_5 anhídrido y se conectó a una bomba de vacío hasta que se alcanzó un valor de a_w de entre 0,005 y 0,01 aproximadamente.

III.9.3.- ISOTERMAS DE ADSORCIÓN

La metodología empleada fue la misma tanto para la lipasa cruda como para la lipasa inmovilizada; la única diferencia surgió al llevar a cabo las isotermas en aire o con disolventes orgánicos.

Para realizar las isotermas en aire se colocó una cantidad determinada (100-200 mg) de lipasa, previamente desecada, en la cámara del aparato medidor; mientras que, para las isotermas con disolvente orgánico, además de la lipasa, se colocó 1 ml de disolvente orgánico

anhídrido.

Una vez colocados en la cámara del aparato medidor de agua, previamente termostañizado a $(25 \pm 0,5)$ °C, las muestras correspondientes, se fueron añadiendo cantidades crecientes (μl) de agua. Tras cada adición se esperó aproximadamente 2h, hasta alcanzar el valor de equilibrio de a_w y se procedió a la lectura del valor de a_w para cada nuevo volumen de agua añadido. La isoterma se dió por finalizada cuando el valor de a_w fue aproximadamente de 0,9; ya que los valores próximos a 1 indican que la lipasa está saturada de agua. Por último, se representó la curva de cantidad de agua añadida por mg de enzima frente a la variación de actividad de agua, ajustandola a un método de splines cúbicos, como se describe a continuación a (*ver III.9.4.*).

III.9.4.- AJUSTE DE LA CURVA DE LA ISOTERMA

El ajuste de las curvas de cantidad de agua añadida por gramo de enzima seca frente a a_w se llevó a cabo empleando el programa COMPARE, incluido dentro del paquete estadístico SIMFIT, versión 4²⁵⁴. Dicho programa está basado en una estrategia empírica de ajuste de curvas por el método denominado de splines cúbicos. Este método consiste en dividir el intervalo (a,b), que contiene los datos por ajustar, en diferentes subintervalos $(a_1, a_2), \dots, (a_{n-1}, a_n)$, de forma que en cada subintervalo (a_i, a_{i+1}) se construye una cúbica c_i (polinomio de grado tres), que sea continua hasta su segunda derivada, de modo que en las uniones de los intervalos (llamados nudos), las cúbicas y sus derivadas 1ª y 2ª coincidan. De esta forma, todas las cúbicas se unen suavemente en los nudos, para formar una única cúbica. El programa COMPARE permite utilizar la curva suavizada mediante splines cúbicos como una curva de calibración, de manera que se puedan llevar a cabo cálculos de la cantidad de muestra seca que presenta una preparación enzimática, de la cual se conozca su valor de a_w , con un porcentaje de confianza del 95 %.

RESULTADOS Y DISCUSION

IV.1.- CARACTERIZACION DE LA LIPASA DE *Rh.miehei*

En la presente Tesis Doctoral se ha estudiado la lipasa producida por el hongo *Rhizomucor miehei*, comercializada por Novo-Nordisk en su forma cruda (Lipozyme® 10000L) e inmovilizada (Lipozyme® IM20) sobre una resina de intercambio aniónico (Duolite A-568). El estudio realizado abarcó los siguientes puntos:

- a).- determinación del contenido protéico
- b).- estudio de la actividad esterásica
- c).- estudio de la actividad lipásica

IV.1.1.- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS

IV.1.1.a.- Lipasa cruda de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme® 10000L)

El primer paso del estudio de la lipasa de *Rh.miehei* fue la determinación de la concentración de proteínas de los diferentes lotes de lipasa cruda utilizados, para lo cual se siguió el método del biuret (*ver III.3.1.a.*). La concentración media de todos los lotes fue (64 ± 2) mg proteína/ml de Lipozyme® 10000L.

Asimismo, se empleó el **método de Bradford** (*ver III.3.1.b.*), para la determinación de la concentración protéica de los lotes de Lipozyme® 10000L que fueron semipurificados por precipitación con sulfato amónico. Este método se empleó con el objeto de evitar las posibles interacciones entre el sulfato amónico y las sales de cobre del reactivo del biuret, que podrían distorsionar el resultado de la determinación protéica. Como se observa en la Tabla 15 los resultados obtenidos con los lotes 4 y 5 son muy similares, por lo que se consideró un valor medio de $(8,1 \pm 0,3)$ mg proteína/ml Lipozyme® 10000L.

Cabe resaltar los diferentes valores de concentración de proteínas obtenidos con cada método. El método del biuret es menos específico ya que el reactivo utilizado interacciona con todos los aminoácidos, por lo que se cuantifican incluso los pequeños péptidos que contaminan la preparación enzimática (Lipozyme® 10000L) y menos sensible, pues trabaja en intervalos de concentración de proteína mayor. Sin embargo, el método de Bradford, basado en la adsorción del reactivo a la superficie protéica es menos sensible para esos pequeños péptidos, por lo que el resultado obtenido es menor.

Dado que el método del biuret resultó ser útil para cuantificar elevadas concentraciones

Caracterización de la lipasa de *Rh.miehei*

de proteína, éste fue el método de rutina seguido para la cuantificación de carga proteica de la lipasa cruda de *Rh.miehei*, excepto como se ha indicado anteriormente, en los experimentos llevados a cabo en presencia de sulfato amónico.

Las rectas de calibrado de ambos métodos aparecen en las secciones *III.3.1.a.* y *III.3.1.b.*, respectivamente.

Tabla 15: Contenido protéico de los distintos lotes de Lipozyme® 10000L.

LOTE	BIURET (mg/ml)	BRADFORD (mg/ml)
1	62±1	
2	64±1	
3	67±1	
4	64±2	8,42±0,01
5	66±1	7,76±0,01

IV.1.1.b.- Lipasa inmovilizada de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme® IM20)

La carga enzimática del derivado comercial Lipozyme® fue determinado por Vázquez y cols.²⁷⁰, los cuales emplearon el método de Gotham y cols.²⁷¹, que es una modificación del método de Bradford para proteínas insolubles. El resultado obtenido indica que la carga proteica del derivado inmovilizado Lipozyme® IM20 es de 0,12 mg proteína/mg de Lipozyme® IM20, siendo éste el valor considerado a lo largo de esta Memoria.

Las enzimas inmovilizadas por adsorción son facilmente desorbidas en medio acuoso. Por ello, el derivado inmovilizado Lipozyme® IM20 fue sometido a un proceso de desorción por abrasión (*ver III.3.4.*) en medio acuoso, a distintos pH, y en ciclohexano, condiciones en las que se utilizaría posteriormente el biocatalizador. Tras el proceso de abrasión se determinó la concentración de proteínas desorbidas del soporte y se calculó el grado de desorción del derivado en los diferentes medios. Los resultados aparecen en la Tabla 16.

- **Tabla 16:** Grado de desorción del derivado Lipozyme® IM20 tras un proceso de abrasión en diferentes medios (t=48h y T°=37°C).

naturaleza del medio	cantidad de derivado (mg)	proteína inicial (mg)	proteína desorbida (mg)	% abrasión
acuoso pH=1	300	36	7,0±0,3	19,4 ±0,8
acuoso pH=7	300	36	3,5±0,3	9,7 ±0,8
acuoso pH=13	300	36	6,2±0,2	17,2 ±0,6
ciclohexano	300	36	0	0

Para determinar la cantidad de proteínas iniciales se consideró el dato de carga enzimática del derivado inmovilizado Lipozyme® IM20 (0,12 mg proteína / mg de Lipozyme® IM20), determinado por Vazquez y cols²⁷⁰.

En medio orgánico la desorción del derivado inmovilizado es nula, lo cual indica que en las reacciones de síntesis de ésteres la carga del derivado inmovilizado no se modifica. Este hecho justifica la elevada actividad observada en las reacciones de esterificación en medio orgánico, catalizadas por Lipozyme® IM20.

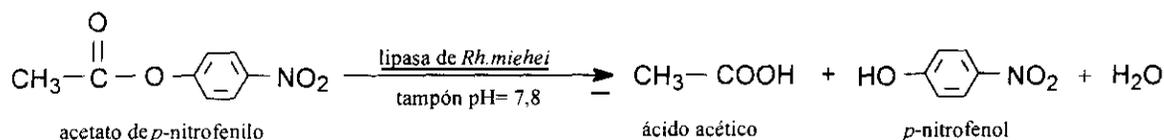
Por el contrario, en medio acuoso sí se produce la desorción de proteína del derivado inmovilizado, factor que es necesario considerar al plantearse experimentos en medio acuoso con este derivado. En medios fuertemente ácidos o básicos, el grado de desorción es más importante que en medio neutro, debido a que en esos medios drásticos la enzima y el soporte sufre mayores alteraciones, con lo que la desorción proteica es mayor. En medio neutro el grado de desorción es menor, siendo éste el pH óptimo de actuación del derivado inmovilizado en soluciones acuosas²⁵¹.

IV.1.2.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ESTERASICA

Siguiendo el proceso de caracterización de la lipasa de *Rh.miehei*, se determinó la actividad esterásica específica de los distintos lotes de lipasa cruda (Lipozyme® 10000L).

La actividad esterásica de la lipasa cruda de *Rh.miehei* se determinó en función de la cantidad de *p*-nitrofenol liberado durante la reacción de hidrólisis del acetato de *p*-nitrofenilo, en medio alcalino (pH=7,8). El aumento de absorbancia producido a 400 nm se

correlaciona con la cantidad de *p*-nitrofenol liberado. (pKa del *p*-nitrofenol = 7,04) (ver III.3.2.)



Esquema 24: Reacción de hidrólisis del acetato de *p*-nitrofenilo.

IV.1.2.a.- Actividad esterásica específica

La actividad específica viene dada por el valor de la pendiente de la recta obtenida al representar la velocidad de reacción frente a la cantidad de proteína.

Con el objeto de determinar la actividad esterásica específica de los lotes 2,3,4 y 5 de lipasa cruda de *Rh.miehei* (Lipozyme® 10000L) se realizaron ensayos estándar con cantidades variables de lipasa. Posteriormente, se representó la velocidad de reacción (mmoles hidrolizados/min) frente a la cantidad de proteína utilizada en cada ensayo (mg proteína, determinado por método del biuret). Como se observa en la Tabla 17 los resultados obtenidos, dentro del intervalo de concentración de proteínas considerado (0,5 a 2,5 mg/ml) y dentro del error experimental, son semejantes en todos los lotes analizados, excepto en el lote 3.

Tabla 17: Actividad esterásica específica de la lipasa cruda de *Rh.miehei*

LOTE	actividad específica (mmol/min mg prot)
2	8,6±0,8
3	5,5±0,3
4	8,2±0,9
5	7,1±0,6

IV.1.2.b.- Determinación de las constantes cinéticas de la actividad esterásica

Para determinar las constantes cinéticas (K_M y k_{cat}) se eligieron dos lotes (2 y 5) y se realizaron diversos ensayos con una cantidad constante de lipasa (0,032 mg proteína, cuantificado por biuret), variando la concentración de la disolución de sustrato (acetato de *p*-

nitrofenilo en acetonitrilo).

Para llevar a cabo el ajuste de los datos de actividad frente a concentración de sustrato se utilizó el programa MMFIT, del paquete estadístico SIMFIT, versión 4.0²⁵⁴. Este programa permite el ajuste de los datos directamente a una hipérbola michaeliana. Los ajustes, a menos que se indique lo contrario se llevaron a cabo con pesos estadísticos proporcionales al 5 % de error.

En las Figuras 33 y 34 se recogen las representaciones de Michaelis-Mente y Eadie-Hofstee, respectivamente de los lotes analizados.

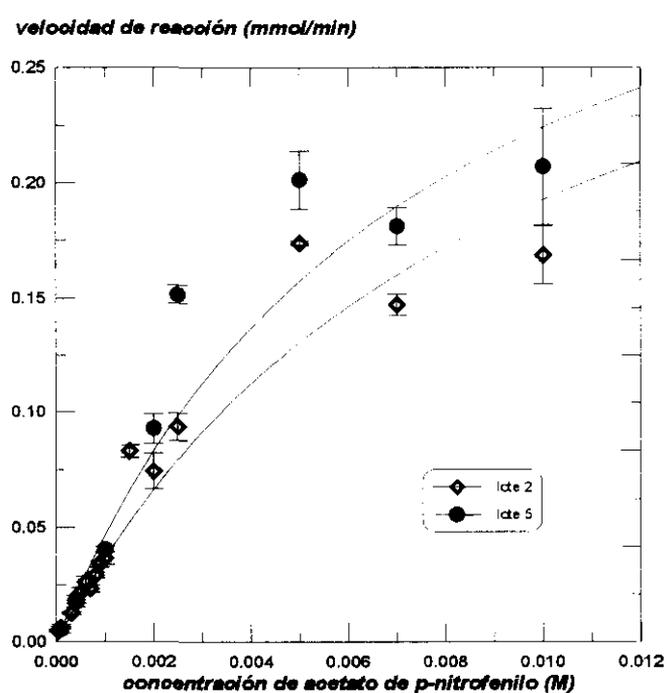


Figura 33: Representación de Michaelis-Menten de la actividad esterásica de los lotes 2 y 5 de lipasa cruda de *Rh. miehei*.

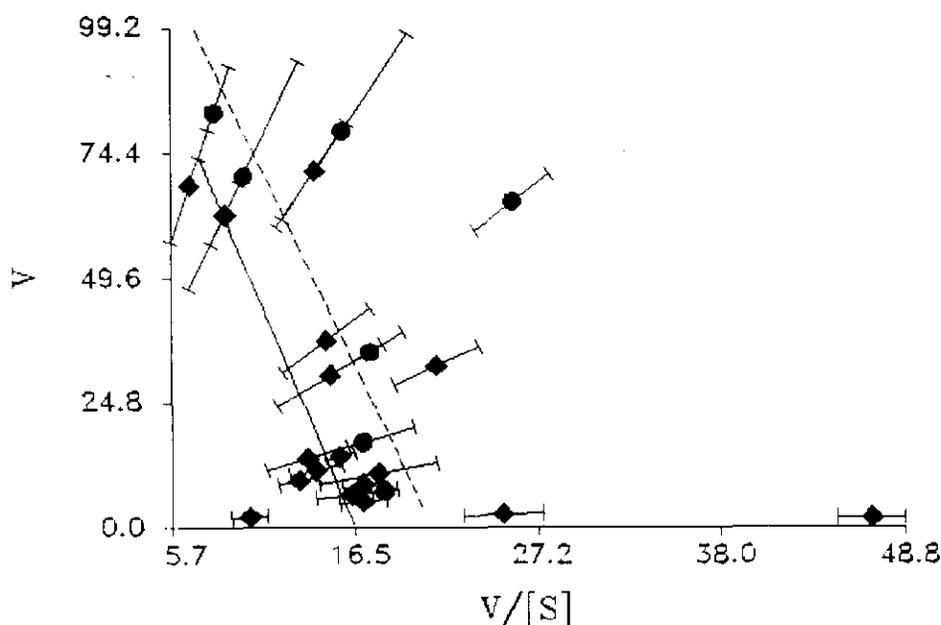


Figura 34: Representación de Eadie-Hofstee de la actividad esterásica de los lotes 2 y 5 de lipasa cruda de *Rh.miehei*.

En la Tabla 18 se recogen los valores de las constantes cinéticas, correspondientes a la actividad esterásica de los lotes de lipasa cruda de *Rh.miehei* estudiados.

Tabla 18: Constantes cinéticas de la actividad esterásica de la lipasa cruda de *Rh.miehei*.

LOTE	K_M [M] de pNPA	k_{cat} (mmol/min mgprot)
2	$(9 \pm 2)10^{-3}$	(11 ± 2)
5	$(7 \pm 1)10^{-3}$	(12 ± 2)

Como se observa en la Tabla 18 el valor de las constantes cinéticas es muy semejante en los dos lotes analizados. Esto indica que, independientemente del lote de Lipozyme® 10000L utilizado, la afinidad de la lipasa por el sustrato (K_M) es semejante y la constante catalítica (k_{cat}) es también semejante, lo que indica una buena homogeneidad en la proteína cruda de partida.

Tras comprobar la similitud de la actividad esterásica específica y de las constantes

cinéticas de los diferentes lotes de lipasa cruda de *Rh.miehei* (Lipozyme® 10000L), empleados a lo largo de la presente Tesis Doctoral, se puede concluir que el lote utilizado no es un factor diferenciador a considerar en la actividad esterásica.

La actividad esterásica de la lipasa inmovilizada Lipozyme® IM20 no se pudo determinar con este método, ya que al ser un sólido insoluble es imposible medir la evolución de la reacción con el espectrofotómetro UV-visible, puesto que las partículas de Lipozyme® IM20 interfieren en la medida de absorbancia, provocando una dispersión de luz que imposibilita las medidas.

IV.1.3.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LIPASICA

En la presente Memoria se ha hecho mayor hincapié en el estudio de la actividad lipásica de la lipasa de *Rh.miehei*, ya que para seguir el transcurso de la reacción no se emplean métodos espectrofotométricos, sino métodos de valoración volumétrica, en los que se pueden utilizar lipasas en cualquier estado físico. Por esta razón, la actividad lipásica se ha utilizado como indicador del grado de modificación funcional sufrida por la enzima tras los procesos de semipurificación e inmovilización desarrollados en esta Memoria.

Como se indicó en la parte experimental, la actividad lipásica se determinó empleando tres métodos; dos de ellos basados en la hidrólisis de aceite de oliva (sustrato Sigma; emulsión de aceite de oliva al 50% (v/v) y uno basado en la hidrólisis de tributirina.

IV.1.3.a.- Hidrólisis de aceite de oliva

En la hidrólisis del aceite de oliva catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* se siguieron dos métodos; en uno de ellos (método A) el ácido liberado se neutralizó en el transcurso de la reacción empleando un pH-stato (*ver III.3.3.a.1.*); mientras que, en el otro método (B) la valoración se hizo a "punto final", valorando el ácido liberado al final de la reacción (*ver III.3.3.a.2.*).

IV.1.3.a.1.- Método A

Determinación de la actividad lipásica específica

Siguiendo este método, basado en la valoración del ácido liberado en el transcurso de la reacción se determinó la actividad lipásica específica de los diferentes lotes de lipasa cruda de *Rh.miehei* (Lipozyme® 10000L). Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla 19.

Tabla 19: Actividad lipásica específica (hidrólisis de aceite de oliva) de la lipasa cruda de *Rh.miehei*. Reacción test: **hidrólisis de aceite de oliva.**

LOTE	actividad específica (mmol/min mgprot)
1	$(3,5 \pm 0,2)10^{-4}$
2	$(2,9 \pm 0,1)10^{-4}$
3	$(1,6 \pm 0,1)10^{-4}$
4	$(2,9 \pm 0,1)10^{-4}$
5	$(2,6 \pm 0,1)10^{-4}$

Los lotes 1, 2, 4 y 5 presentan una actividad lipásica específica similar, dentro del error experimental, mientras que el lote 3 presenta menor actividad, como ocurrió en la actividad esterásica (Tabla 17). Este hecho se tuvo en consideración en posteriores estudios, evitando utilizar el lote 3 en procesos en los que la comparación de la actividad lipásica fuera fundamental.

Determinación de las constantes cinéticas

Las constantes cinéticas (K_M y k_{cat}) se determinaron únicamente con los lotes 2 y 5, los mismos que se utilizaron para determinar las constantes cinéticas de la actividad esterásica. En las Figuras 35 y 36 aparecen las correspondientes representaciones de Michaelis-Mente y de Eadie-Hofstee de la reacción de hidrólisis de aceite de oliva catalizada por la lipasa cruda de *Rh.miehei*.

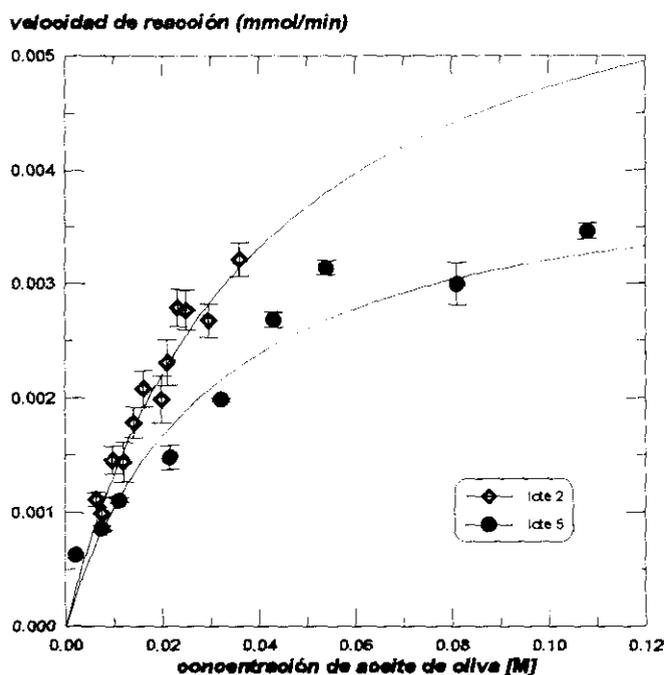


Figura 35: Representación de Michaelis-Menten de la actividad lipásica de los lotes 2 y 5 de lipasa cruda de *Rh.niehei*. Reacción test: hidrólisis de aceite de oliva.

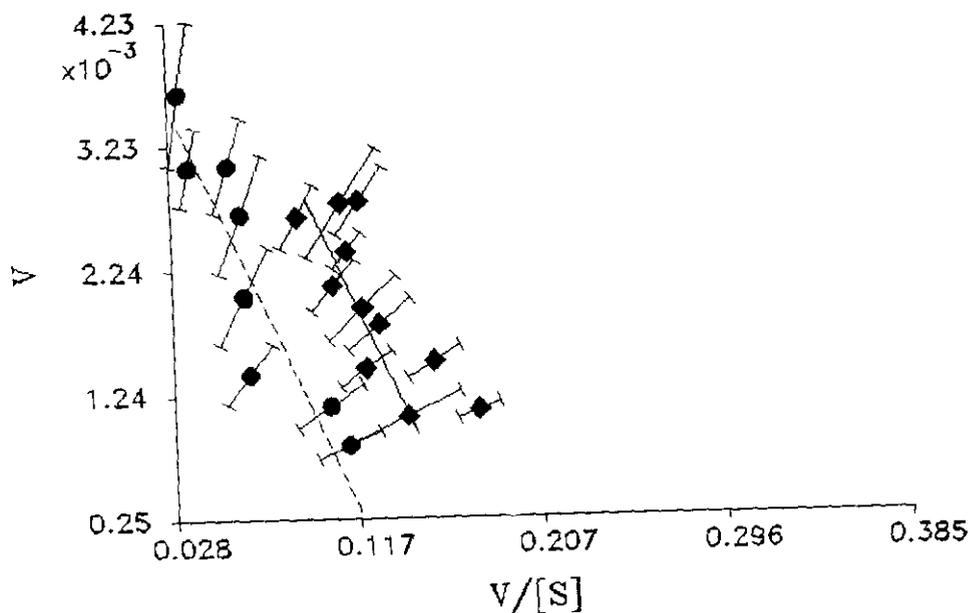


Figura 36: Representación de Eadie-Hofstee de la actividad lipásica de los lotes 2 y 5 de lipasa cruda de *Rh.niehei*. Reacción test: hidrólisis de aceite de oliva.

Caracterización de la lipasa de *Rh.miehei*

En la Tabla 20 se recogen los resultados de las constantes cinéticas de esta reacción para cada lote de enzima estudiado.

Tabla 20: Constantes cinéticas de la actividad lipásica de la lipasa cruda de *Rh.miehei*. Reacción test: **hidrólisis de aceite de oliva.**

LOTE	K_M [M] de aceite oliva	k_{cat} (mmol/min mgprot)
2	$(39 \pm 7) 10^{-3}$	$(1,0 \pm 0,1) 10^{-3}$
5	$(30 \pm 5) 10^{-3}$	$(0,62 \pm 0,06) 10^{-3}$

El valor de K_M (constante de afinidad enzima-sustrato) es similar en los dos lotes; lo mismo sucede, considerando el error experimental, con el valor de k_{cat} (constante catalítica).

Tras este estudio, se puede concluir que todos los lotes empleados son semejantes tanto en concentración de proteínas, como en actividad enzimática (esterásica y lipásica), excepto el lote 3, que fue descartado.

Este método no se pudo emplear para la lipasa inmovilizada (Lipozyme[®] IM20), ya que la resina de intercambio aniónico (Duolite A-568) utilizada como soporte es de naturaleza fuertemente ácida y surgieron una serie de problemas técnicos para ajustar el pH a 7 antes de comenzar la valoración.

IV.1.3.a.2.- Método B

El ácido liberado durante la reacción de hidrólisis del aceite de oliva se valoró volumetricamente al final de la reacción. La velocidad de reacción se determinó por diferencia entre la muestra problema y un blanco de reacción.

El objetivo perseguido con este método era la determinación de la actividad comparada del derivado inmovilizado comercial (Lipozyme[®] IM20) con la lipasa cruda, ya que en esta metodología no era necesario ajustar el pH del medio de reacción y por tanto se evitaba el principal inconveniente del método A.

Determinación de la actividad lipásica específica

Las actividades lipásicas específicas de Lipozyme® 10000L y Lipozyme® IM20 aparecen en la Tabla 21. Esta actividad se expresa en (UI/1 mg proteína), tal y como se indica en el protocolo descrito por Tietz²⁶¹ (ver III.3.3..a.1)

Tabla 21: Actividad lipásica específica de la lipasa de *Rh.miehei*. Reacción test: **hidrólisis de aceite de oliva.**

ENZIMA	actividad específica (UI/ 1 mg prot)
Lipozyme 10000L	16±2
Lipozyme IM20	1,0±0,6

Como se esperaba, la actividad lipásica de la lipasa inmovilizada es notablemente inferior a la de la lipasa cruda. Esto no se debe relacionar con la abrasión del 9,7 % de proteína (ver Tabla 16) observada, sino posiblemente con el hecho de que no todas las moléculas de enzima adsorbidas son activas. Este tipo de desactivación ha sido descrita por Wang y cols.²⁷² para la lipasa de *C.rugosa* adsorbida y se atribuye a una interacción distorsionante entre la proteína y el soporte polar-hidrófilo, establecida en función de los datos de calorimetría de barrido y fluorescencia de superficie²⁷³.

El dato de actividad enzimática obtenido con el derivado IM20 se ha utilizado para determinar la carga enzimática del mismo. Para ello se interpoló la actividad lipásica obtenida con 1500mg de Lipozyme® IM20, en la recta de actividad de la enzima cruda (ver Figura 28) y se determinó que la actividad de este ensayo equivale a (24±9) mg de proteína de lipasa cruda. De esta forma, se calculó la carga enzimática de Lipozyme® IM20, expresada en función de la actividad lipásica retenida, que fue de (0,016±0,006) mg de proteína activa en hidrólisis / mg de Lipozyme® IM20.

Considerando la carga enzimática estimada para este derivado Lipozyme® IM20 como 0,12 mg proteína/mg derivado²⁷⁰ y teniendo en cuenta la abrasión que se produce en medio acuoso a pH=7,0 (ver Tabla 16), deberían liberarse al medio (17±2) mg de proteína, valor semejante a la cantidad de proteína (24±9) obtenida tras interpolar en la recta de la Figura

28. Por tanto, podría pensarse que la actividad hidrolítica observada para Lipozyme[®] IM20 es consecuencia de la total desorción del contenido protéico de dicho derivado durante el transcurso de la reacción (3h), de forma que la lipasa expulsada al medio se comporta como enzima libre, manteniendo ésta su actividad hidrolítica inalterada.

IV.1.3.b.- Hidrólisis de tributirina

La evolución de la reacción de hidrólisis de tributirina catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* se siguió mediante valoraciones volumétricas con un pH-stato (*ver III.3.3.b.*), tal y como se hizo en el método A anteriormente descrito. Esta metodología es la recomendada por Novo-Nordisk para la determinación de la actividad lipásica²⁶².

Determinación de la actividad lipásica específica

Siguiendo esta metodología se pudo determinar la actividad específica de la lipasa cruda, de las lipasas inmovilizada comercial (Lipozyme[®] IM20) e inmovilizada sobre sílice durante la presente y de la lipasa semipurificada por precipitación con sulfato amónico y posteriormente inmovilizada sobre sílice. Esto nos permitió comparar las actividades lipásicas de todas estas enzimas y evaluar las consecuencias de la inmovilización y de la semipurificación sobre la actividad de la lipasa de *Rh.miehei*. Este método solo se aplicó al lote 5 de la lipasa cruda (Lipozyme[®] 10000L), ya que se comprobó, en los ensayos de hidrólisis de aceite de oliva, que la actividad lipásica de todos los lotes era semejante.

En este apartado solo comentaremos los resultados obtenidos con las lipasas comerciales, ya que, los resultados de las lipasas semipurificadas e inmovilizada sobre sílice se comentarán en secciones posteriores. En la Tabla 22 se recogen los resultados de actividad lipásica específica en la reacción de hidrólisis de tributirina para las dos preparaciones comerciales de lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada.

Tabla 22: Actividad lipásica específica de la lipasa cruda e inmovilizada de *Rh.miehei*. Reacción test: **hidrólisis de tributirina.**

ENZIMA	actividad específica (mmol/min mg prot.)
Lipozyme® 10000L	$(88 \pm 4)10^{-3}$
Lipozyme® IM20	$(3,8 \pm 0,4)10^{-3}$

La actividad lipásica específica de la lipasa cruda es muy superior a la de la enzima inmovilizada. Como se indicó anteriormente (*ver Tabla 21*), este hecho era de esperar, ya que las lipasas inmovilizadas por adsorción presentan una baja actividad en reacciones de hidrólisis.

Determinación de las constantes cinéticas

También, se determinaron las constantes cinéticas de la reacción de hidrólisis de tributirina catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada sobre una resina de intercambio aniónico (Lipozyme® IM20). Las representaciones de Michaelis-Mente y de Eadie-Hofstee aparecen en las Figuras 37 y 38.

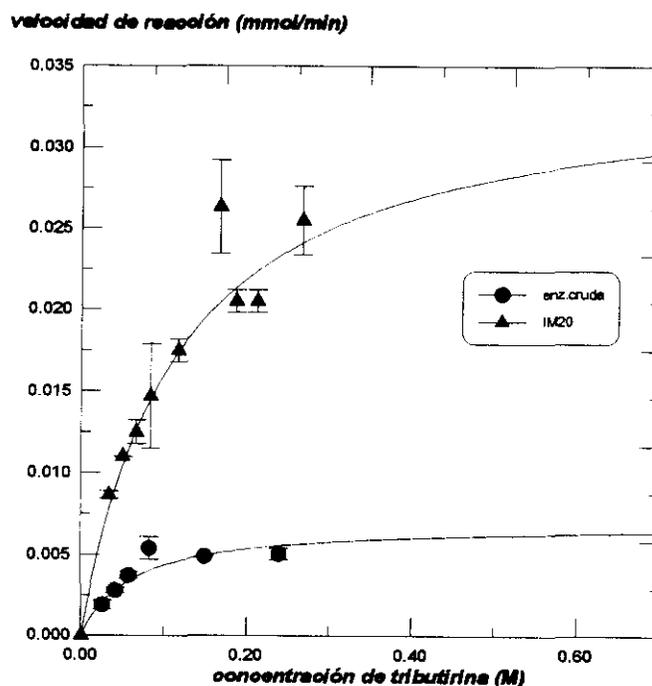


Figura 37: Representación de Michaelis-Menten de actividad lipásica de la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada por adsorción (IM20). Reacción test: **hidrólisis de tributirina.**

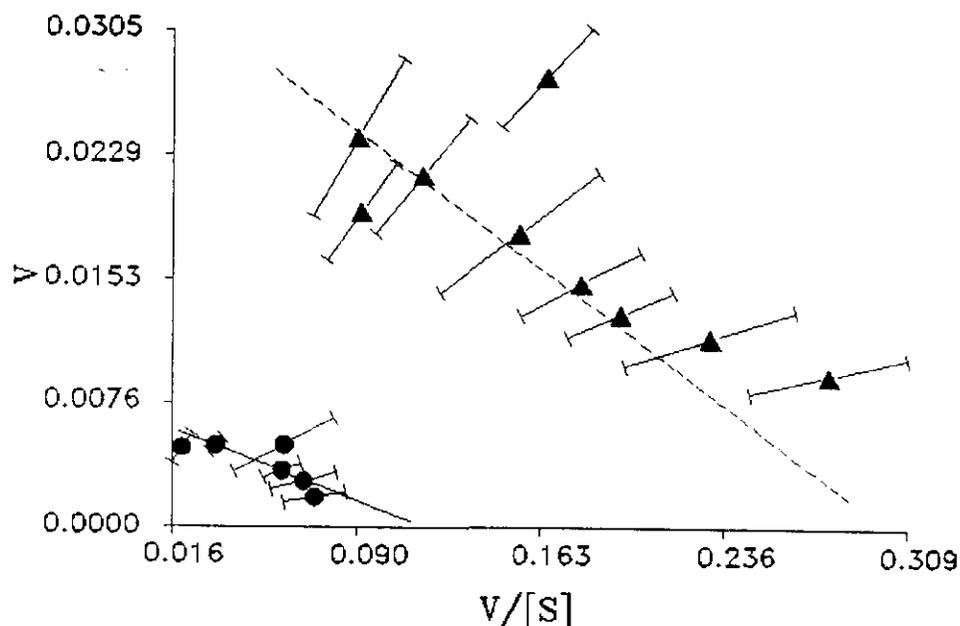


Figura 38: Representación de Eadie-Hofstee de actividad lipásica de la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada por adsorción (IM20). Reacción test: **hidrólisis de tributirina.**

Los valores de las constantes cinéticas (K_M y k_{cat}) de la actividad lipásica de ambas enzimas se recogen en la Tabla 23.

Tabla 23: Constantes cinéticas de la actividad lipásica de la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada por adsorción (IM20). Reacción test: **hidrólisis de tributirina.**

ENZIMA	K_M [M] de tributirina	k_{cat} (mmol/min mgprot)
Lipozyme® 10000L	$(60 \pm 10) 10^{-3}$	$0,13 \pm 0,01$
Lipozyme® IM20	$(115 \pm 30) 10^{-3}$	$0,014 \pm 0,001$

Las conclusiones obtenidas tras el análisis de las constantes cinéticas de la lipasa cruda e inmovilizada son semejantes a las del estudio de sus actividades lipásicas específicas. De esta forma, se confirma, como era de esperar, que la actividad lipásica en la reacción de hidrólisis de tributirina es mucho menor para la lipasa inmovilizada por adsorción, puesto que tanto la formación de la interfase (cuantificada según K_M^{33}), como el rendimiento de la reacción (cuantificada por k_{cat}) son peores para el derivado inmovilizado Lipozyme® IM20.

Tras comparar los resultados obtenidos para la lipasa cruda (Lipozyme® 10000L) con ambos sustratos (*ver Tablas 21 y 22*), se comprueba que el valor de K_M varía ligeramente, siendo algo menor en la reacción de hidrólisis del aceite de oliva ($K_M = 35 \cdot 10^{-3} \text{ M}$), ya que la formación de la interfase es mejor para este sustrato debido a su mayor carácter lipóide, por lo que la afinidad enzima-sustrato es también mejor. No obstante, la actividad catalítica es mucho mejor para la reacción de hidrólisis de tributirina, con un incremento de k_{cat} 200 veces superior a la reacción con aceite de oliva ($k_{cat} = 6,2 \cdot 10^{-4} \text{ mmol/min mg}$).

IV.1.4.- ELECTROFORESIS

Las electroforesis fueron realizadas por el Dr. García-Cañero del Departamento de Bioquímica Analítica del Hospital Puerta de Hierro de Madrid.

En la Figura 39 se muestra la electroforesis de la lipasa cruda de *Rh.miehei* (Lipozyme® 10000L), realizada en condiciones reductoras (*ver III.3.5.*).

La columna de la izquierda corresponde a los patrones de proteína utilizados y la columna de la derecha a la lipasa de *Rh.miehei*. La flecha indica la banda correspondiente a 30 kD, peso molecular de la enzima analizada.

En la electroforesis se observa que la preparación comercial, Lipozyme® 10000L, de la lipasa cruda de *Rh.miehei* presenta gran cantidad de proteínas contaminantes de elevado peso molecular (70-80 kD). Asimismo, aunque en menor proporción, aparecen proteínas contaminantes de bajo peso molecular (10kD).

A continuación, se llevaron a cabo diversos métodos de semipurificación con el objetivo de eliminar las proteínas contaminantes. Los resultados obtenidos se comentarán en el apartado siguiente *IV.2.*



Figura 39: Electroforesis de la lipasa cruda de *Rh.miehei*, realizada en condiciones reductoras.

IV.2.- SEMIPURIFICACION DE LA LIPASA DE *Rh. miehei*

Como ya se indicó en la Parte Experimental (*ver III.4.*) la presente Tesis Doctoral se llevó a cabo la semipurificación de la lipasa cruda de *Rhizomucor miehei* siguiendo dos tipos de metodologías:

a).- basados en la separación de proteínas en función de su tamaño molecular (ultrafiltración y diálisis)

b).- basados en la separación protéica por diferencias de solubilidad (precipitación con sulfato amónico)

IV.2.1.- ULTRAFILTRACION

La lipasa cruda de *Rh.miehei* se ultrafiltró catorce veces consecutivas (*ver III.4.1.a.*), determinando en cada uno de los residuos obtenidos la concentración de proteínas remanente por el método del biuret.

La membrana semipermeable utilizada separó las moléculas de peso molecular inferior a 10 kD. Esta membrana se eligió con el objeto de eliminar las proteínas contaminantes de menor tamaño, ya que el peso molecular de la lipasa de *Rh.miehei* es de 30 kD ³⁸.

En la Figura 40 se representa la progresiva disminución del contenido de proteínas en el residuo obtenido tras sucesivas ultrafiltraciones.

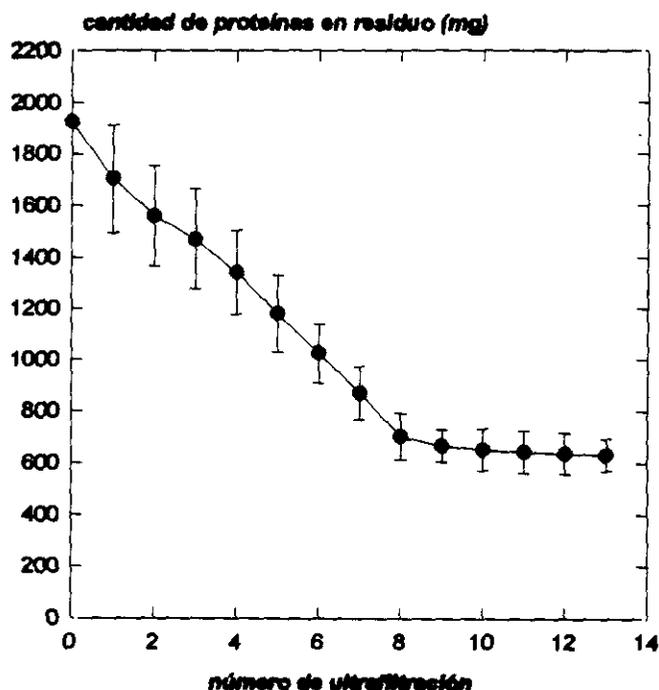


Figura 40: Evolución del contenido proteico de la lipasa de *Rh.miehei* tras sucesivas ultrafiltraciones.

Como se observa en la Figura 40, durante las primeras ultrafiltraciones se produce una importante disminución del contenido proteico de la lipasa de *Rh.miehei*, pero a partir de la novena ultrafiltración se estabiliza la cantidad de proteínas del residuo. lo cual indica que ya se han eliminado practicamente todas las proteínas de peso molecular inferior a 10 kD, las cuales representan un 69% de las proteínas totales determinadas por el método del biuret. Como se indicó anteriormente (*ver IV.1.1.*) este método de determinación de proteínas es poco específico, ya que el reactivo utilizado forma complejos coloreados de cobre con todos los péptidos de la preparación enzimática. Tras las múltiples ultrafiltraciones se confirma la existencia de gran cantidad de pequeños péptidos contaminantes, que reaccionarían con el reactivo de cobre, por lo que la concentración de proteínas determinada según este método es mayor que la determinada por el método de Bradford, ya que este último es un método basado en la adsorción del reactivo coloreado a la superficie proteica, por lo que es más difícil que esos pequeños péptidos sean cuantificados.

IV.2.2.- DIALISIS Y CENTRIFUGACION

El objetivo perseguido con este método es, igual que con la ultrafiltración, la eliminación de péptidos de bajo peso molecular que acompañan a la lipasa cruda de *Rh.miehei* (Lipozyme® 10000L).

La lipasa no dializada no se pudo congelar por métodos convencionales debido al elevado contenido en azúcares de la preparación comercial Lipozyme® 10000L, que retienen gran cantidad de moléculas de agua, con lo que se dificulta el proceso de congelación. Tras el proceso de diálisis se logró congelar la lipasa semipurificada, lo cual indica que durante la diálisis no solo se eliminaron proteínas de bajo peso molecular, sino también azúcares que contaminan la preparación comercial de lipasa de *Rh.miehei*.

Como ya se indicó en la Parte Experimental (*ver III.4.1.b.*) se empleó una membrana de diálisis adecuada para separar proteínas con un peso molecular inferior a 12-14 kD.

Tras la diálisis se llevaron a cabo sucesivas centrifugaciones a 5000 r.p.m.. Con cada uno de los sobrenadantes obtenidos se realizaron determinaciones de la concentración de proteínas y de actividad esterásica y lipásica (*ver III.3.2. y III.3.3.*). La nomenclatura utilizada para designar las distintas fracciones fue la siguiente:

D → lipasa dializada

DC → sobrenadante dializado + 1 centrifugación

D2C → sobrenadante dializado + 2 centrifugaciones

D3C → sobrenadante dializado + 3 centrifugaciones

R → residuo obtenido tras la tercera centrifugación.

IV.2.2.a.- Determinación de la concentración de proteínas

En la Tabla 24 aparece la concentración de proteínas del lote 2 de partida, de la lipasa dializada y de los residuos y sobrenadantes obtenidos tras sucesivas centrifugaciones, obtenidos por el método del biuret.

Semipurificación de la lipasa de *Rh.miehei*

Tabla 24: Contenido protéico (según método del biuret) de las fracciones obtenidas por diálisis y sucesivas ultrafiltraciones de la lipasa de *Rh.miehei*.

fracción protéica	cantidad proteínas (mg)	
LOTE 2	955±18	
dializada	277±16	
	<i>residuo</i>	<i>sobrenadante</i>
dializada + 1 centrifugación	117±1	160±2
dializada + 2 centrifugación	50±1	67±1
dializada + 3 centrifugación	48±7	1,4±0,2

Tras la diálisis se redujo en un 70% el contenido protéico de la lipasa de *Rh.miehei*. Como consecuencia de la primera centrifugación de la enzima dializada, se perdió un 57% de las proteínas. Tras redissolver el residuo (DC) y centrifugarlo de nuevo el contenido protéico pasó de 117 mg en DC a 50 mg en D2C, con lo que la reducción de proteínas fue de nuevo del 57%. Sin embargo, aunque se centrifugó por tercera vez el contenido de proteínas del residuo D3C permaneció constante.

Este método de semipurificación de la lipasa de *Rh.miehei*, en función del tamaño molecular de las proteínas, resultó ser mucho más sencillo y breve que el método anterior de sucesivas ultrafiltraciones. Por esta razón, se continuó con la caracterización de la lipasa semipurificada por diálisis y sucesivas centrifugaciones, determinando las actividades específicas lipásica y esterásica.

IV.2.2.b.- Determinación de la actividad esterásica

El ensayo de referencia utilizado para determinar la actividad esterásica de la lipasa de *Rh.miehei* fue la reacción de hidrólisis de acetato de *p*-nitrofenilo, tal y como se describió en la Parte Experimental (ver III.3.2.).

Para determinar la actividad esterásica específica de la lipasa cruda (lote 2) se consideró un intervalo de proteínas similar al contenido protéico de la lipasa semipurificada, debido a que la representación de la actividad esterásica de la lipasa cruda frente a la

concentración de proteínas dá lugar a una gráfica no lineal, la cual a efectos prácticos, se descompuso en dos intervalos entre 0 y 0,75 mg/ml y 0,75 y 3 mg/ml (Figura 41), que se ajustaron a dos rectas para, en función del intervalo considerado, emplear una u otra.

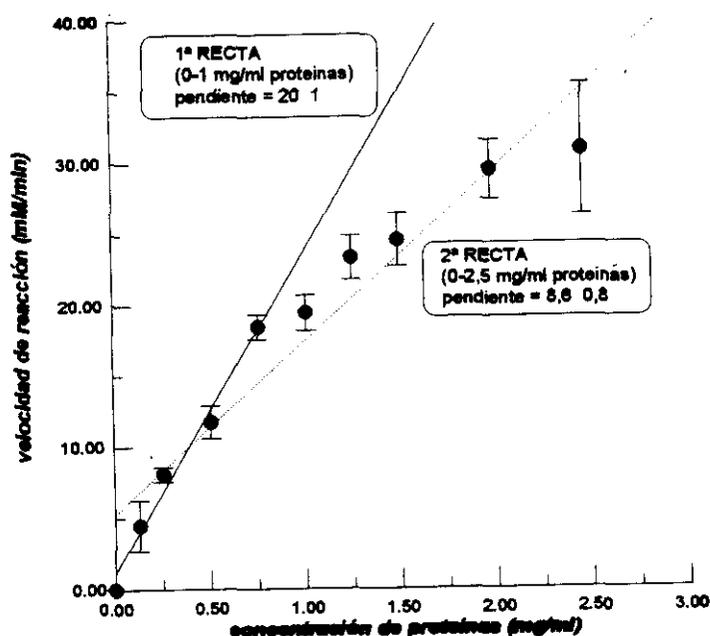


Figura 41: Actividad esterásica del lote 2 de la lipasa cruda de *Rh.miehei*.

A continuación, en la Figura 42 se representa la actividad esterásica específica de la lipasa de *Rh.miehei* cruda, dializada, de los sobrenadantes obtenidos tras centrifugar sucesivas veces la lipasa dializada y del residuo formado tras la tercera centrifugación.

Semipurificación de la lipasa de *Rh.miehei*

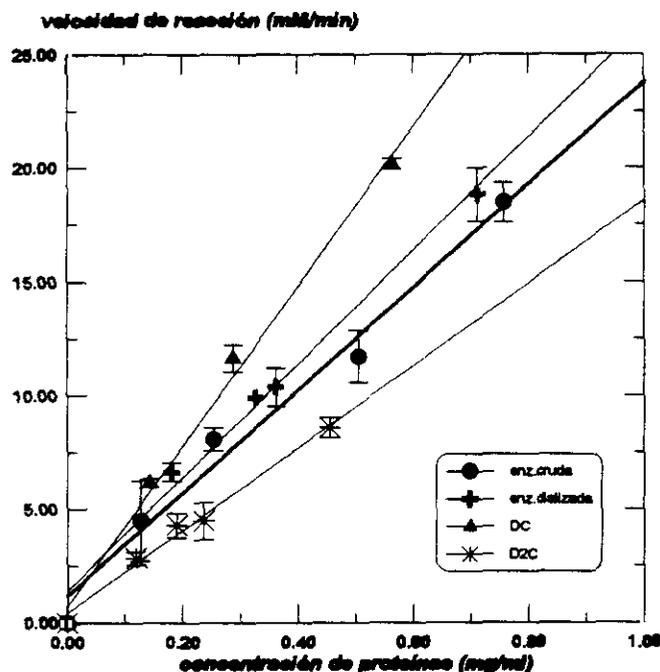


Figura 42: Actividad esterásica de la lipasa de *Rh.miehei* semipurificada por diálisis y de los sobrenadantes obtenidos tras sucesivas centrifugaciones

En la Tabla 25 se recogen esterásicas específicas de la lipasa cruda de *Rh.miehei*, de la lipasa dializada, de los sobrenadantes obtenidos tras centrifugar sucesivas veces la lipasa dializada y del residuo formado tras la tercera centrifugación. Asimismo, se indica para cada enzima, su correspondiente valor de factor de semipurificación (F), definido como la relación de la actividad específica de la enzima semipurificada respecto de la enzima cruda.

Tabla 25: Actividad esterásica específica de la lipasa de *Rh.miehei* semipurificada y cruda.

fracción protéica	actividad esterásica (mmol/min mgprot) ^a	F
LOTE 2	20±1	
dializada (D)	22±1	1,1
dializada + 1 centrif. (DC)	34±1	1,7
dializada + 2 centrif. (D2C)	16±2	0,8
dializada + 3 centrif. (D3C)	0	0
residuo (R)	0	0

(^a)determinación de proteínas por el método del biuret. (F)factor de purificación

Analizando los resultados indicados en la tabla y figura anteriores se observa que tras el proceso de diálisis el incremento de la actividad esterásica de la lipasa de *Rh.miehei* es muy poco significativo; solamente tras la primera centrifugación se obtiene un cierto incremento de actividad. Por lo que se puede deducir que tras la diálisis se han eliminado proteínas no activas y sustancias contaminantes, que no influían en la actividad esterásica de la enzima.

Tanto el residuo como el sobrenadante obtenidos tras la tercera centrifugación carecen de actividad esterásica, debido a su escaso contenido protéico (Tabla 24).

IV.2.2.c.- Determinación de la actividad lipásica

En la Figura 43 se representa la actividad lipásica de la lipasa de *Rh.miehei* cruda, semipurificada por diálisis y de los residuos obtenidos tras someter a la lipasa dializada a sucesivas centrifugaciones. La reacción test utilizada para determinar la actividad lipásica de estas enzimas fue la hidrólisis de aceite de oliva, según el método A, descrito en el apartado III.3.3.a.1.

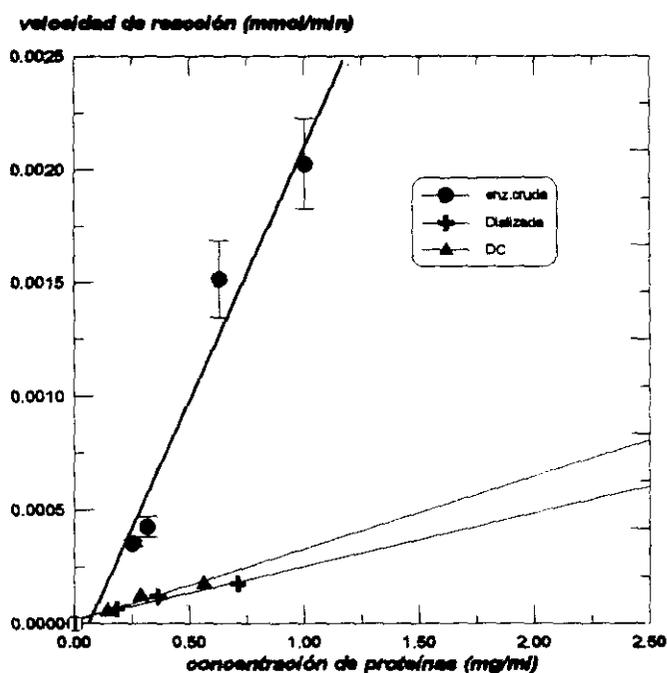


Figura 43: Actividad lipásica de la lipasa de *Rh.miehei* semipurificada por diálisis y de los sobrenadantes obtenidos tras sucesivas centrifugaciones. Reacción test: hidrólisis de aceite de oliva.

Semipurificación de la lipasa de *Rh.miehei*

Tabla 26: Actividad lipásica específica de la lipasa de *Rh.miehei* cruda y semipurificada.
Reacción test: **hidrólisis de aceite de oliva.**

fracción protéica	actividad específica (mmol/min mg prot.)	F
LOTE 2	$(2,9 \pm 0,4) 10^{-4}$	1,0
dializada	$(4,4 \pm 0,4) 10^{-5}$	0,15
dializada + 1 centrifugación	$(6,6 \pm 0,8) 10^{-5}$	0,22

A diferencia de lo que sucede con la actividad esterásica, la actividad lipásica sufre una considerable disminución tras el proceso de diálisis. Este hecho debe atribuirse a la eliminación de moléculas pequeñas (azúcares, sobre todo) que acompañan a esta preparación (Lipozyme® 10000L), y que son indispensables para el mantenimiento de la actividad lipásica, ya que permiten la unión de la enzima a la interfase oleo-acuosa. Este efecto ya ha sido descrito para la lipasa de *C.rugosa* por Lamare y cols.²⁷⁴, los cuales demostraron que la eliminación por diálisis de la lactosa del preparado comercial provoca una drástica disminución de la actividad lipásica, sin afectar a la actividad esterásica.

IV.2.3.- SEMIPURIFICACION DE PROTEINAS POR PRECIPITACION TRAS LA ADICION DE SULFATO AMONICO.

Como ya se indicó en la Parte Experimental (*ver III.4.2.*) se preparó un gradiente de disoluciones de la lipasa cruda de *Rh.miehei* con distinto grado de saturación de sulfato amónico. La formación de precipitado solo se produjo en las disoluciones con más de un 50% de saturación; por tanto, fue con los residuos obtenidos tras centrifugar dichas disoluciones con las que se llevó a cabo la caracterización enzimática.

IV.2.3.a.- Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas de los precipitados obtenidos se realizó por el método de Bradford, ya que el método del biuret no era válido en este caso debido a las posibles interferencias que podrían producirse entre el reactivo del biuret y el sulfato amónico.

En la Tabla 27 aparecen los resultados de concentración de proteínas de los residuos

(dializados y no dializados) obtenidos por precipitación de las proteínas con diferentes grados de saturación con sulfato amónico. Los resultados se expresan en miligramos de proteína por mililitro de disolución, ya que estos residuos se recogieron y se diluyeron en tampón Tris-HCl (50 mM) pH=8,0.

Tabla 27: Concentración de proteínas de la lipasa semipurificada por precipitación con sulfato amónico y posterior diálisis. **Método de Bradford.**

% saturación con sulfato amónico	precipitado NO dializado (mg/ml)	precipitado dializado (mg/ml)
50 %	0,72±0,04	0,45±0,03
60 %	2,21±0,03	1,37±0,04
70 %	2,31±0,03	1,63±0,03
80 %	3,80±0,04	1,74±0,05
LOTE 5	7,76±0,01	

Tras el análisis de los resultados obtenidos se puede observar que existe una relación directa entre el grado de saturación con sulfato amónico y la concentración de proteínas precipitadas, ya que cuanto mayor es el porcentaje de saturación mayor es la concentración del precipitado protéico. Al aumentar la concentración de sulfato amónico se eliminan más moléculas de la superficie protéica para solvatar las moléculas de sal, provocando la agregación de mayor cantidad de moléculas de enzima. También se observa que tras la diálisis, la cantidad de proteínas disminuye sensiblemente, especialmente en los precipitados con mayor contenido protéico.

Con el fin de comparar las actividades específicas de la lipasa cruda de *Rh.miehei* y la lipasa semipurificada se aplicó un factor de corrección para expresar los miligramos de proteína según el mismo método de determinación protéica (método de Bradford). Dicho factor de conversión, aplicado a la actividad expresada en cantidad de proteínas según el método del biuret, fue (8,5±0,9), valor calculado al correlacionar los valores de la concentración de proteínas obtenidos por ambos métodos (ver Tabla 15) Los valores de actividad específica y constante catalítica (k_{cat}) en los que se ha aplicado dicho factor se indicarán por un asterisco (*).

Semipurificación de la lipasa de *Rh.miehei*

IV.2.3.b.- Electroforesis

En la Figura 44 aparece la electroforesis de la lipasa de *Rh.miehei* semipurificada.



Figura 44: Electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras de la lipasa de *Rh.miehei* semipurificada por precipitación con sulfato amónico.

Las dos primeras bandas desde el lado derecho de la electroforesis corresponden al patrón de proteínas. Las bandas 3 y 4 corresponden a la lipasa semipurificada por precipitación en una solución con un 50 % de saturación de sulfato amónico; las siguientes bandas corresponden a la lipasa de *Rh.miehei* semipurificada con un 60, 70 y 80 % de saturación de sulfato amónico, respectivamente.

En estas electroforesis, se observa que la enzima purificada por precipitación con un 50% de sulfato amónico presenta una banda intensa (90%) en la zona correspondiente al peso molecular de la lipasa de *Rh.miehei* (30kD).

En los otros preparados la bandas a 30 kD sigue siendo la más significativa, pero al aumentar la cantidad de sulfato amónico utilizado, aumenta la intensidad de las bandas contaminantes de peso molecular superior, debido a que el proceso de agregación protéica es mayor.

Tras el estudio de estas electroforesis, se puede concluir que la precipitación de la lipasa cruda comercial de *Rh.miehei* (Lipozyme® 10000L) con un 50% de saturación de sulfato amónico permite la purificación casi total de dicha lipasa.

IV.2.3.c.- Determinación de la actividad esterásica

Una vez conocida la concentración protéica de cada uno de los residuos obtenidos tras la precipitación con sulfato amónico, se procedió a la determinación de la actividad esterásica remanente, para analizar el grado de modificación de esta actividad tras el proceso de

semipurificación, que está determinado por el factor de semipurificación (F).

Determinación de la actividad esterásica específica

En la Figura 45 se representan las rectas de variación de la velocidad de la reacción de hidrólisis del acetato de *p*-nitrofenilo frente a la concentración de proteínas de la lipasa cruda de *Rh.miehei* y la lipasa semipurificada por precipitación con distintos porcentajes de saturación con sulfato amónico. En la Figura 46a y 46b se representan las rectas de actividad esterásica de la lipasa semipurificada por precipitación con sulfato amónico sin y con posterior diálisis.

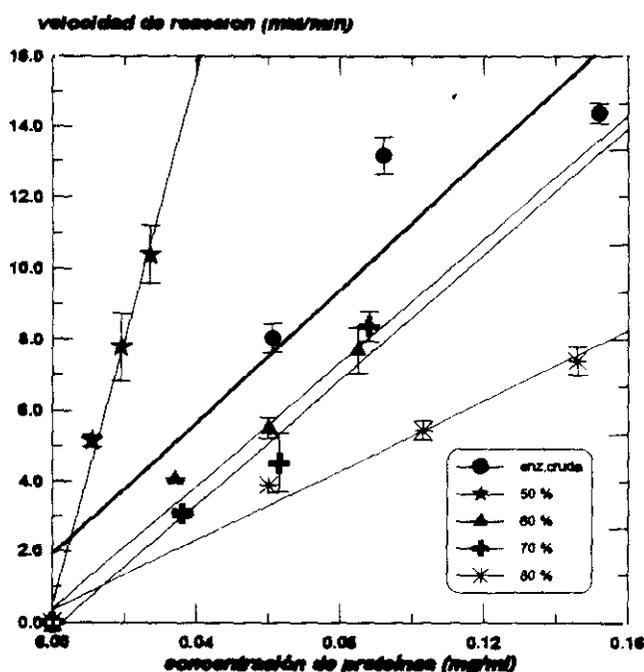


Figura 45: Comparación de la actividad esterásica específica de la lipasa *Rh.miehei* cruda y semipurificada por precipitación con distintos grados de saturación de sulfato amónico.

Semipurificación de la lipasa de *Rh.miehei*

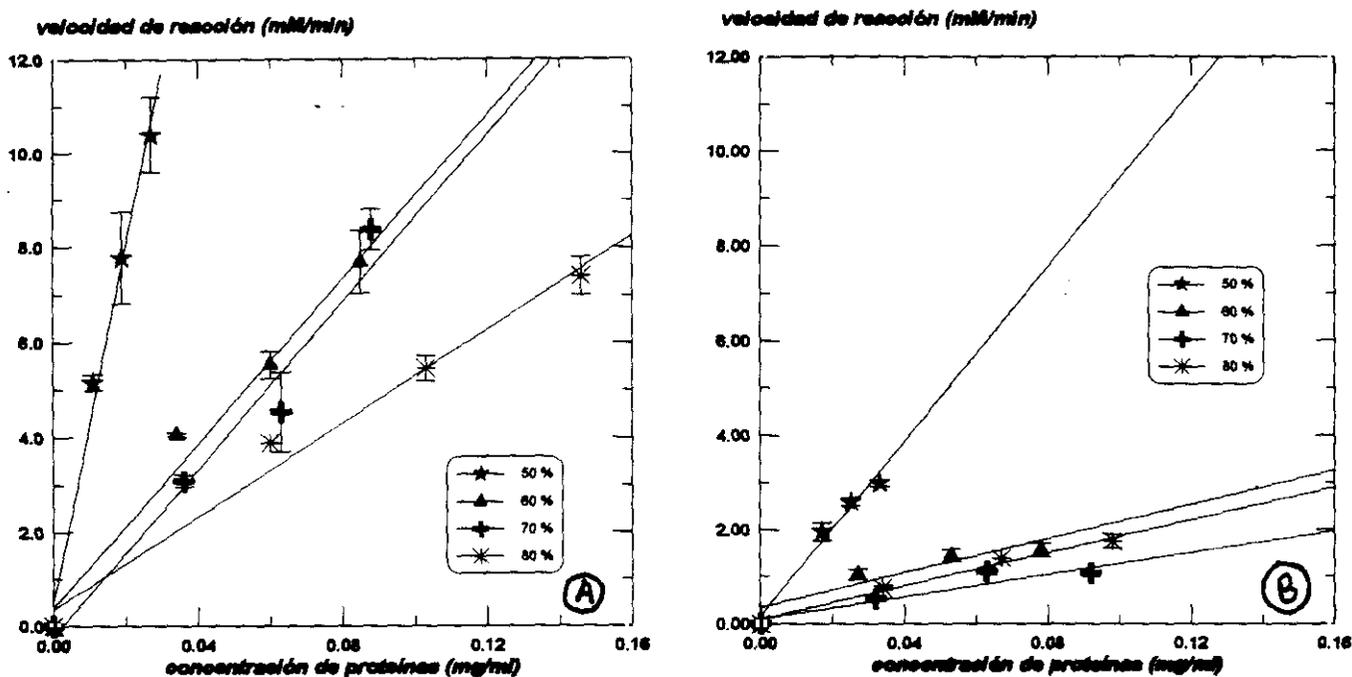


Figura 46: **Actividad esterásica específica** de la lipasa semipurificada por precipitación con distinto grado de saturación de sulfato amónico. **A)** sin posterior diálisis, **B)** con posterior diálisis.

En la Tabla 28 se recogen los valores de actividad esterásica específica para cada residuo, tanto dializado como sin dializar. La actividad específica se expresó por cantidad de proteínas determinadas según el método de Bradford.

Tabla 28: **Actividad esterásica específica** de la lipasa de *Rh.miehei* cruda y semipurificada por precipitación con distinto grado de saturación de sulfato amónico (con y sin posterior diálisis).

saturación con sulfato amónico (%)	precipitado NO dializado		precipitado dializado	
	(mmol/min mgprot)	F	(mmol/min mgprot)	F
50 %	321±28	5,3	68±10	1,1
60 %	67±6	1,1	11±2	0,2
70 %	72±14	1,2	9±2	0,1
80 %	40±2	0,6	16±1	0,2
LOTE 5	60±5 (*)	1		

(*) se aplicó el factor de corrección ($f=8,5\pm0,9$) para expresar la cantidad de proteína según el método de Bradford.

A la vista de estos resultados, se puede concluir que la precipitación de las proteínas con un 50% de saturación de sulfato amónico supone un importantísimo incremento de la actividad esterásica con respecto a la lipasa cruda. Por el contrario, la precipitación con mayor cantidad de sulfato (60 y 70 % de saturación) supone una mínima modificación de la actividad, respecto de la lipasa cruda y una disminución de esta actividad esterásica cuando la saturación es del 80% (Figura 45 y 46a)

Como resultado de la diálisis posterior (Figura 46b) se produce una fuerte pérdida de la actividad esterásica de la enzima. Este hecho confirma los resultados negativos, en cuanto a la actividad esterásica del proceso de diálisis, comentado anteriormente (ver IV.2.2.b.; Tabla 25).

Determinación de las constantes cinéticas de la actividad esterásica

A continuación, se determinaron las constantes cinéticas de la reacción de hidrólisis del acetato de *p*-nitrofenilo catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* cruda y semipurificada con un 50% de saturación de sulfato amónico. Se eligió esta enzima semipurificada porque fue la que presentó mayor actividad esterásica.

En la Figura 47 se representan las curvas de Michaelis-Menten de la actividad esterásica de la lipasa cruda de *Rh.miehei* y semipurificada con un 50 % de saturación con sulfato amónico. En la Figura 48 se muestra la representación lineal de Eadie-Hofstee de la ecuación de Michaelis-Menten.

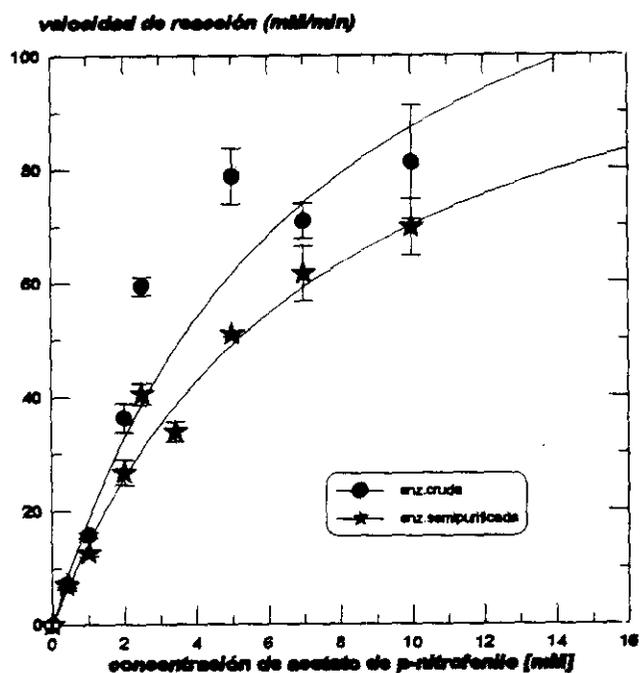


Figura 47: Curvas de Michaelis-Mente de actividad esterásica de la lipasa *Rh.miehei* cruda y semipurificada por precipitación con sulfato amónico al 50% de saturación.

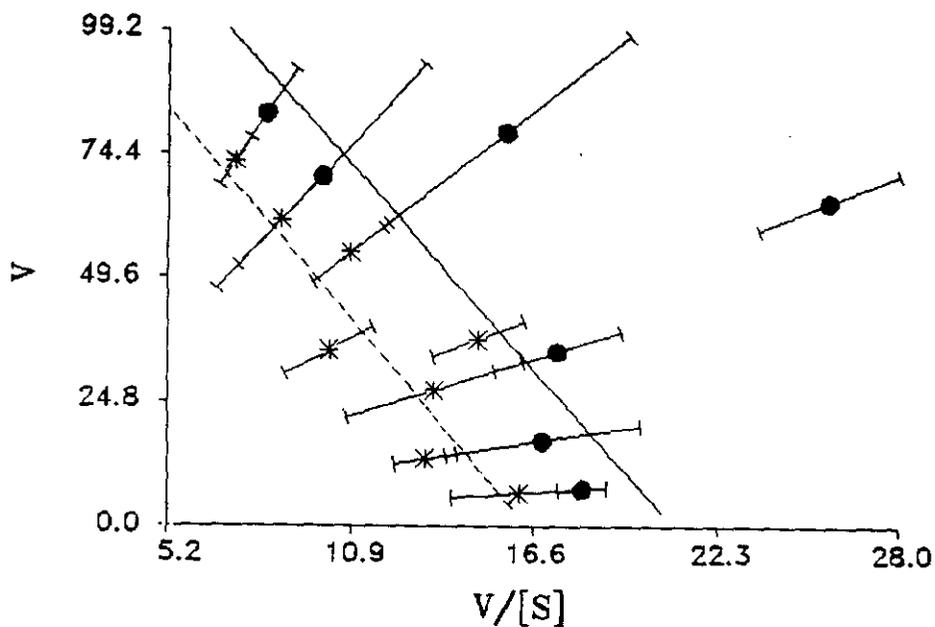


Figura 48: Representación de Eadie-Hofstee de actividad esterásica de la lipasa *Rh.miehei* cruda y semipurificada por precipitación con sulfato amónico al 50% de saturación.

En la Tabla 29 aparecen los resultados obtenidos, comparados con los valores de la lipasa antes de la semipurificación.

Tabla 29: Constantes cinéticas de actividad esterásica de la lipasa cruda y semipurificada por precipitación con un 50% de sulfato amónico.

ENZIMA	K_M [M]	k_{cat} (mmol/min mgprot)
cruda	$(7\pm 1)10^{-3}$	$102\pm 17(*)$
SP	$(7\pm 1)10^{-3}$	82 ± 7

(*) se aplicó el factor de corrección ($f=8,5\pm 0,9$) para expresar la cantidad de proteína según el método de Bradford.

Analizando las constantes cinéticas se observa que la lipasa de *Rh.miehei*, tras el proceso de semipurificación por precipitación con un 50% de saturación de sulfato amónico conserva su comportamiento cinético de actividad esterásica, puesto que el valor de las constantes cinéticas (k_{cat} y K_M) es similar para la lipasa cruda y para la lipasa semipurificada, dentro del error experimental. Por el contrario, se produce un aumento un incremento notable de la actividad esterásica específica (Tabla 28), expresada por cantidad de proteína, debido a la eliminación de impurezas contaminantes.

IV.2.3.d.- Determinación de la actividad lipásica

IV.2.3.d.1.- Hidrólisis de aceite de oliva

Para comparar la actividad lipásica de las lipasas de *Rh.miehei* semipurificadas, con distinto grado de saturación de sulfato amónico, se empleó como reacción test la hidrólisis de aceite de oliva siguiendo el método A (ver III.3.3.a.1.).

En la Figura 49 se representan las rectas de variación de la velocidad lipásica, en la reacción de hidrólisis de aceite de oliva, de la lipasa cruda (lote 5) y de la lipasa semipurificada por precipitación con distintos grados de saturación con sulfato amónico. En las Figuras 50a y 50b se representan también la actividad lipásica de la lipasa semipurificada por precipitación sin y con posterior diálisis.

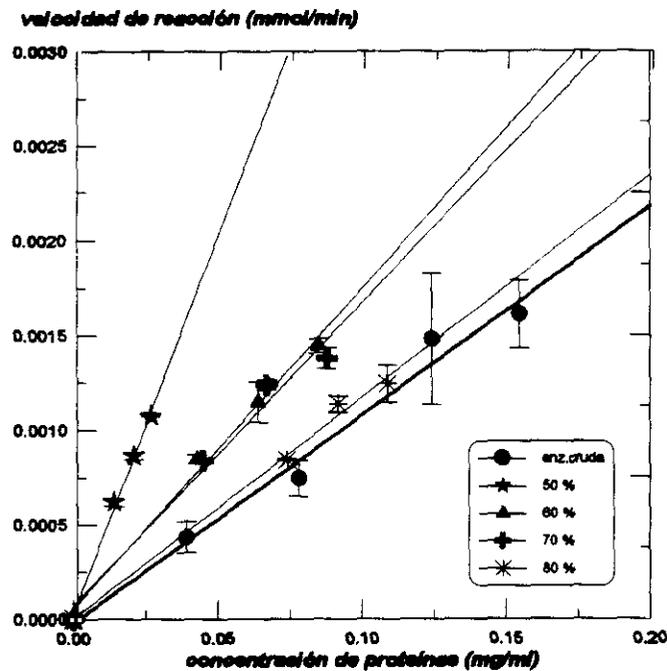


Figura 49: Comparación de la actividad lipásica específica de la lipasa *Rh. miehei* cruda y semipurificada por precipitación con distintos grados de saturación de sulfato amónico. Reacción test: hidrólisis de aceite de oliva (método A)

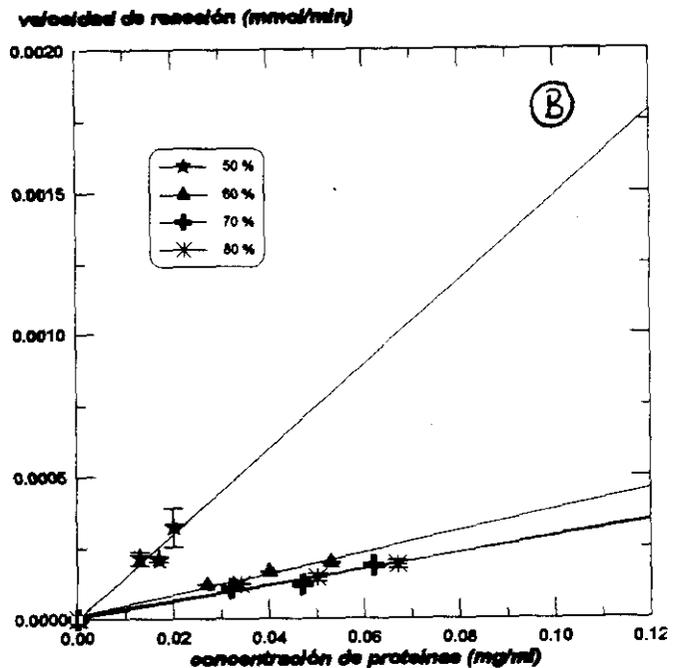
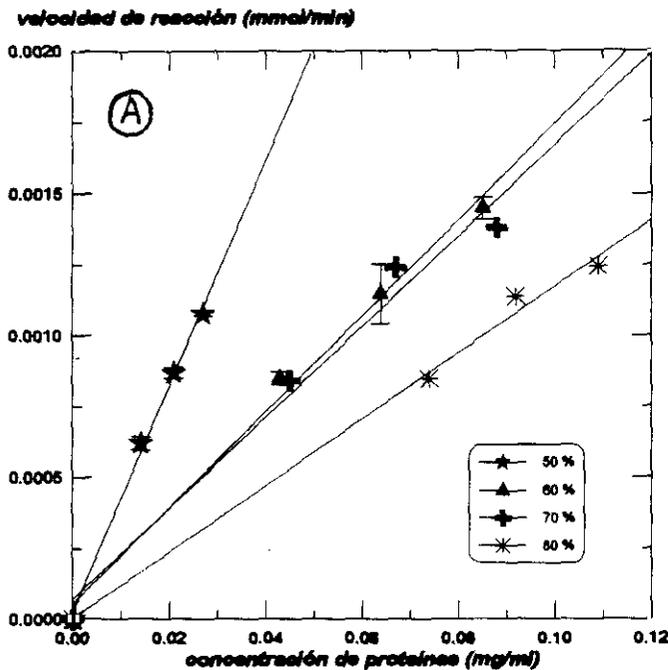


Figura 50: Actividad lipásica específica de la lipasa semipurificada por precipitación con distinto grado de saturación de sulfato amónico. A) sin posterior diálisis, B) con posterior diálisis. Reacción test: hidrólisis de aceite de oliva (método A)

En la Tabla 30 se recogen los valores de las actividades lipásicas específicas de los precipitados protéicos obtenidos, tanto dializados como sin dializar, en la reacción de hidrólisis de aceite de oliva.

Tabla 30: Actividad lipásica específica de la lipasa de *Rh.miehei* semipurificada por precipitación con sulfato amónico (con y sin posterior diálisis). **Hidrólisis de aceite de oliva (método A)**

saturación con sulfato amónico (%)	precipitado NO dializado (mmol/min mg)		precipitado dializado (mmol/min mg)	
		F		F
50 %	$(7,0 \pm 0,2)10^{-3}$	3,2	$(2,0 \pm 0,4)10^{-3}$	0,9
60 %	$(2,8 \pm 0,2)10^{-3}$	1,3	$(0,6 \pm 0,1)10^{-3}$	0,3
70 %	$(3,0 \pm 0,2)10^{-3}$	1,4	$(0,4 \pm 0,2)10^{-3}$	0,2
80 %	$(2,1 \pm 0,2)10^{-3}$	1,0	$(0,3 \pm 0,1)10^{-3}$	0,1
LOTE 5	$(2,2 \pm 0,3)10^{-3} (*)$			

F factor de purificación

(*) se aplicó el factor de corrección ($f=8,5 \pm 0,9$) para expresar la cantidad de proteína según el método de Bradford.

De estos resultados se puede deducir que la purificación por precipitación con sulfato amónico al 50% de saturación dá lugar a una proteína con mayor actividad lipásica específica que la lipasa cruda comercial (Lipozyme® 10000L) (Tabla 19). No obstante, el proceso de diálisis reduce la actividad lipásica (hidrólisis de aceite de oliva), tal como se observó en la sección anteriormente (ver IV.2.2.c.; Tabla 26). Así pues, se puede concluir que la purificación de la lipasa de *Rh.miehei* por diálisis reduce la actividad lipásica debido probablemente a la eliminación de moléculas de polisacáridos unidos a la proteína no covalentemente, y que favorecen la unión de la lipasa (glicoproteína) a la interfase oleoacuosa, proceso indispensable para el desarrollo de la actividad lipásica de las lipasas.

IV.2.3.d.2.- Hidrólisis de tributirina

Al intentar determinar las constantes cinéticas de la reacción de hidrólisis de aceite de oliva catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* semipurificada por precipitación con sulfato amónico al 50% de saturación, surgieron grandes problemas debido a la poca sensibilidad del

Semipurificación de la lipasa de *Rh.miehei*

método para medir la variación de la actividad al variar ligeramente la concentración de sustrato. Por esta razón se utilizó el método de hidrólisis de tributirina (*ver III.3.3.b.*) que presenta una mayor sensibilidad y es el método recomendado por el laboratorio Novo-Nordisk²⁶², productor de los lipasas comerciales Lipozyme[®] IM20 y 10000L para estudiar la actividad lipásica de esta enzima.

Determinación de la actividad lipásica

Una vez comprobado que el procedimiento experimental de semipurificación con el que se obtienen mejores resultados de actividad lipásica fue saturando la enzima con un 50% de sulfato amónico se repitió la semipurificación bajo esas condiciones, pero a mayor escala y se determinó su actividad lipásica específica por la reacción de hidrólisis de tributirina. Los resultados de estos ensayos, para la lipasa cruda de *Rh.miehei* (lote 5) y semipurificada (SP), aparecen en la Figura 51, representando las rectas de velocidad de reacción (hidrólisis de tributirina) frente a concentración de proteínas, determinada por el método de Bradford.

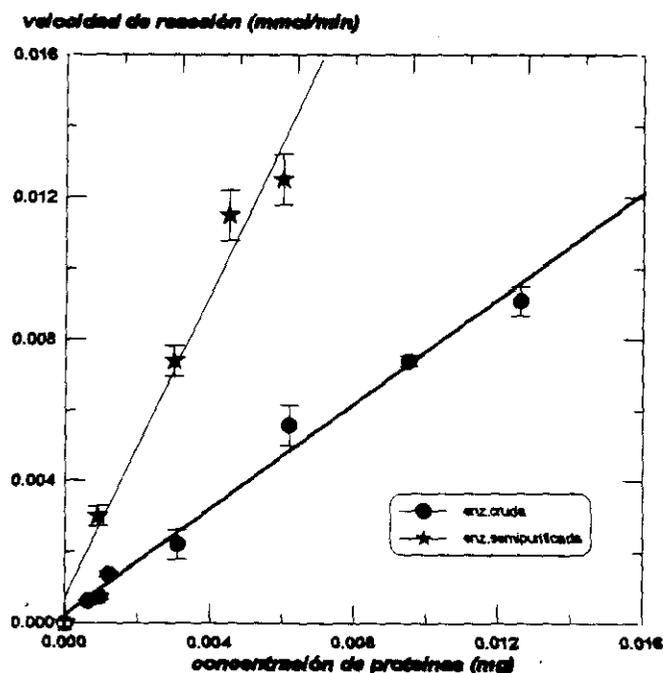


Figura 51: Rectas de actividad lipásica de la lipasa cruda de *Rh.miehei* y semipurificada por precipitación con un 50% de saturación con sulfato amónico. Reacción test: **hidrólisis de tributirina.**

El valor de las pendientes de dichas rectas, que determinan la actividad lipásica específica de la lipasa cruda y semipurificada aparecen en la Tabla 31.

Tabla 31: Actividad lipásica específica de la lipasa de *Rh.miehei* cruda y semipurificada por precipitación con un 50 % de saturación de sulfato amónico. Reacción test: **hidrólisis de tributirina.**

ENZIMA	actividad específica (mmol/min mg)	F
cruda	0,75±0,04 (*)	1,0
SP	2,0±0,1	2,6

F (factor de purificación)

(*) se aplicó el factor de corrección (f=8,5±0,9) para expresar la cantidad de proteína según el método de Bradford.

Tras la semipurificación por precipitación, con un 50% de saturación de sulfato amónico, se produce un importante aumento en la actividad de la lipasa de *Rh.miehei* en la reacción de hidrólisis de tributirina. El factor de semipurificación (F) expresado en función de la actividad lipásica es semejante en las dos reacciones test utilizadas: hidrólisis de aceite de oliva (F= 3,2)(ver Tabla 30) y de tributirina (F=2,6)(ver Tabla 31)

Determinación de las constantes cinéticas de actividad lipásica

Una vez determinada la actividad lipásica específica de la lipasa de *Rh.miehei* cruda y semipurificada (SP) se llevó a cabo la determinación de las constantes cinéticas de la reacción de hidrólisis de tributirina catalizada por dichas enzimas.

En la Figura 52 se representan las curvas de Michaelis-Menten para ambas lipasas y en la Figura 53 aparece la representación de Eadie-Hofstee, con la cual se representa linealmente la ecuación de Michaelis-Menten.

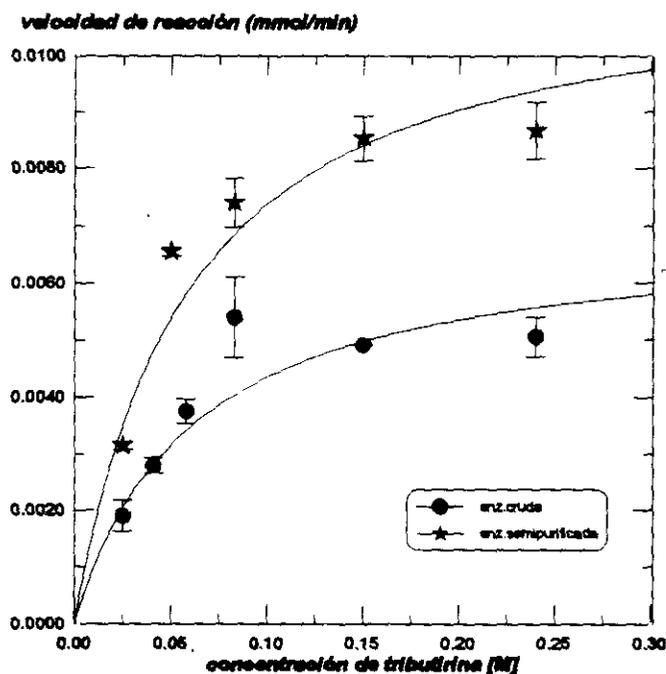


Figura 52: Comparación de las curvas de actividad lipásica de la lipasa cruda y semipurificada por precipitación con sulfato amónico al 50% de saturación, ajustadas a la ecuación de Michaelis-Menten. Reacción test: **hidrólisis de tributirina**.

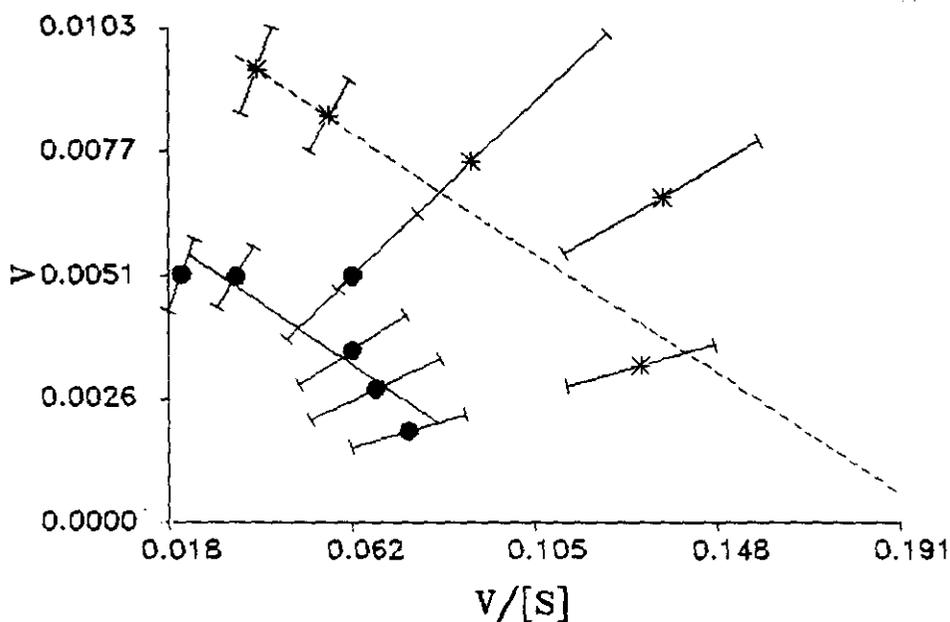


Figura 53: Representación de Eadie-Hofstee de actividad lipásica de la lipasa *Rh.miehei* cruda y semipurificada por precipitación con sulfato amónico al 50%. Reacción test: **hidrólisis de tributirina**.

Los valores de las constantes cinéticas de actividad lipásica de la lipasa de *Rh.miehei* cruda y semipurificada por precipitación con un 50% de saturación de sulfato amónico (SP) aparecen en la Tabla 32.

Tabla 32: Constantes cinéticas de la lipasa cruda y semipurificada por precipitación. Reacción test: hidrólisis de tributirina.

ENZIMA	K_M [M]	k_{cat} (mmol/min mg)
cruda	0,06±0,01	1,10±0,08(*)
SP	0,06±0,01	3,8±0,3

(*) se aplicó el factor de corrección ($f=8,5±0,9$) para expresar la cantidad de proteína según el método de Bradford.

Como ocurría con la actividad esterásica (*ver IV.2.3.a.; Tabla 29*), el valor de la constante de Michaelis (K_M) es igual para ambas enzimas debido a que la concentración de sustrato en la interfase es similar en ambos casos. Por el contrario, el número de recambio (k_{cat}) es superior para la enzima semipurificada debido al aumento de la actividad lipásica como consecuencia de la eliminación de contaminantes.

IV.2.3.d.- Estudio de la estabilidad térmica de la lipasa de *Rh.miehei* cruda y semipurificada

Una vez analizada la variación de la actividad lipásica y esterásica de la lipasa de *Rh.miehei* cruda y semipurificada se estudió la termoestabilidad de dichas enzimas. Dicho estudio se aplicó únicamente a la lipasa semipurificada por precipitación con un 50% de sulfato amónico porque fue la enzima semipurificada más activa y sobre la que se han centrado los estudios posteriores.

Como se indicó en la parte experimental (*ver III.5.3.*), las enzimas se mantuvieron a diferentes temperaturas (37 y 50 °C) en un medio similar al de la reacción de hidrólisis de tributirina, reacción test de análisis de la termoestabilidad de la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada.

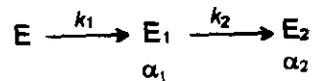
Las curvas de desactivación enzimática obtenidas se ajustaron a una ecuación de decrecimiento exponencial simple (ecuación 29), para lo cual se utilizó el programa EXFIT

Semipurificación de la lipasa de *Rh. miehei*

del paquete integrado SIMFIT versión 4 ²⁵⁴:

$$\text{Actividad residual} = A e^{-kt} + c \quad [29]$$

Para explicar los resultados obtenidos se utilizó el modelo de Henley y Sadana²⁷⁴, representado en el Esquema 25:



Esquema 25: Esquema de desactivación enzimática.

donde k_1 y k_2 son las constantes cinéticas de desactivación; E , E_1 y E_2 son las actividades específicas de la enzima y de los intermedios formados durante el proceso de desactivación y α_1 y α_2 son las relaciones entre las actividades específicas de la enzima y cada uno de los intermedios de desactivación, $\alpha_1 = E_1/E$ y $\alpha_2 = E_2/E$

Estos autores consideran que la constante del ajuste (A), a un tiempo determinado es el promedio de las actividades específicas de cada estado (ecuación 30), siendo E_0 la actividad inicial a $t=0$.

$$A = \frac{E + \alpha_1 E_1 + \alpha_2 E_2}{E_0} \quad [30]$$

Esta constante puede expresarse en función de los parámetros iniciales como se indica en la ecuación 31, en la que se consideran decrecimientos exponenciales simples para describir

En las Figuras 54 A y B se representan la evolución de la actividad residual de ambas enzimas a 37°C (Figuras A) y 50°C (Figura B).

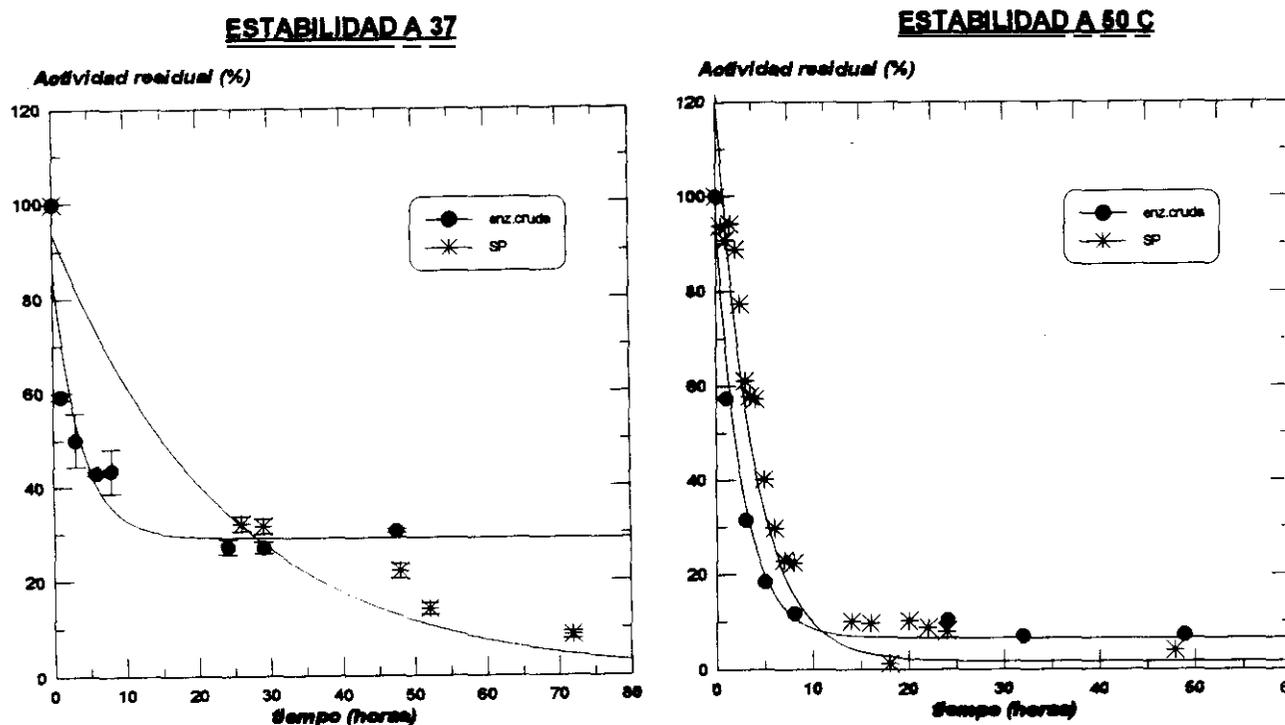


Figura 54: Curvas de desactivación de la lipasa de *Rh. miehei* cruda y semipurificada por precipitación con un 50% de saturación de sulfato amónico. A) a 37 °C y B) a 50 °C.

A partir de los ajustes obtenidos se calcularon los valores de los parámetros de dicha ecuación: constante del ajuste (A), relación de actividades (α_1), constante cinética de desactivación (k_1) y actividad remanente ($c = \alpha_2$), que aparecen en la Tabla 33.

Semipurificación de la lipasa de *Rh.miehei*

Tabla 33: Parámetros de desactivación enzimática a 37 y 50 °C de la lipasa de *Rh.miehei* cruda y semipurificada por precipitación con un 50% de sulfato amónico.

ENZIMA	T (°C)	A (%)	α_1 (%)	k (h ⁻¹)	$\alpha_2=c$ (%)
cruda	37	57±5	43±3	0,27±0,05	29±2
SP	37	92±4	7,7±0,3	0,047±0,006	0
cruda	50	88±7	12±0,9	0,38±0,03	6,6±0,4
SP	50	96±3	4±0,01	0,17±0,01	0

A la vista de estos resultados se observa que aunque el proceso de desactivación enzimática es más lento para la lipasa semipurificada (SP), ya que su constante de desactivación (k) es menor a ambas temperaturas, esta enzima (SP) es menos termoestable debido a la pérdida total de su actividad con el tiempo, puesto que su actividad remanente final (c) es cero, mientras que la lipasa cruda aunque se desactiva más rápidamente al principio mantienen cierta actividad.

Desde el punto industrial, aunque la lipasa semipurificada es más activa y el método de obtención es muy sencillo y de bajo coste, presenta el gran inconveniente de su baja estabilidad a lo largo del tiempo, por lo que se sometió a un proceso de inmovilización con el objeto de incrementar su estabilidad y permitir su utilización a gran escala.

IV.2.4.- CONCLUSIONES OBTENIDAS TRAS LA SEMIPURIFICACION DE LA LIPASA DE *Rh.miehei*

Tras semipurificar la lipasa de *Rh.miehei* por tres métodos distintos dos de ellos basados en la separación de proteínas en función de su tamaño molecular y otro en función de su solubilidad, se puede concluir que la metodología más adecuada es la precipitación de proteínas por saturación con sulfato amónico. Este método es experimentalmente más sencillo que las sucesivas ultrafiltraciones y los resultados obtenidos son más satisfactorios que los obtenidos tras el proceso de diálisis y sucesivas centrifugaciones, ya que tras la diálisis se produce una importante pérdida de la actividad lipásica, aunque no varía la actividad esterérica.

La lipasa de *Rh.miehei* se semipurificó utilizando distintas cantidades de sulfato amónico (expresadas en porcentaje de saturación), obteniendo los mejores resultados con un 50% de saturación. El contenido protéico del precipitado en estas condiciones fue menor que el de los precipitados obtenidos con mayor saturación de la sal, debido a que el grado de purificación alcanzado fue mayor, como se comprobó tras el análisis de los precipitados por electroforesis, ya que el precipitado obtenido con un 50% de saturación presentaba una banda en la zona de 30 kD, correspondiente al peso molecular de la lipasa de *Rh.miehei* (30kD), teniendo en cuenta el posible error experimental. De esta forma, se confirma la total purificación de la lipasa cruda comercial de *Rh.miehei* (Lipozyme® 10000L) por un método experimental muy sencillo (precipitación con un 50% de saturación de sulfato amónico). Además, se comprobó que la lipasa purificada presentaba mayor actividad lipásica y esterásica que la lipasa cruda.

Todos estos precipitados fueron posteriormente dializados, pero los resultados de actividad enzimática, lipásica y esterásica fueron muy pobres, por lo que se decidió considerar el proceso de semipurificación sin posterior diálisis. En conclusión, el método óptimo para semipurificar la lipasa de *Rh.miehei*, entre los analizados en la presente Tesis Doctoral, ha sido la semipurificación por precipitación con un 50 % de saturación de sulfato amónico.

Esta metodología se escaló con gran reproducibilidad y se analizó en profundidad el comportamiento de la lipasa semipurificada obtenida. Para cuantificar el grado de semipurificación se utilizó el factor de semipurificación (F), que relaciona la actividad de la enzima semipurificada con la actividad de la enzima cruda. Este factor es algo mayor para la actividad esterásica (F=5,3) que para la actividad lipásica lipásica (hidrólisis de aceite de oliva F=3,2 e hidrólisis de tributirina F=2,6) y en todos los casos el factor de semipurificación es superior a la unidad, lo que indica que se ha producido un aumento considerable de la actividad enzimática.

El estudio de las constantes cinéticas de la actividad esterásica (hidrólisis de acetato de *p*-nitrofenilo) muestra un comportamiento semejante para la enzima cruda y la

Semipurificación de la lipasa de *Rh. miehei*

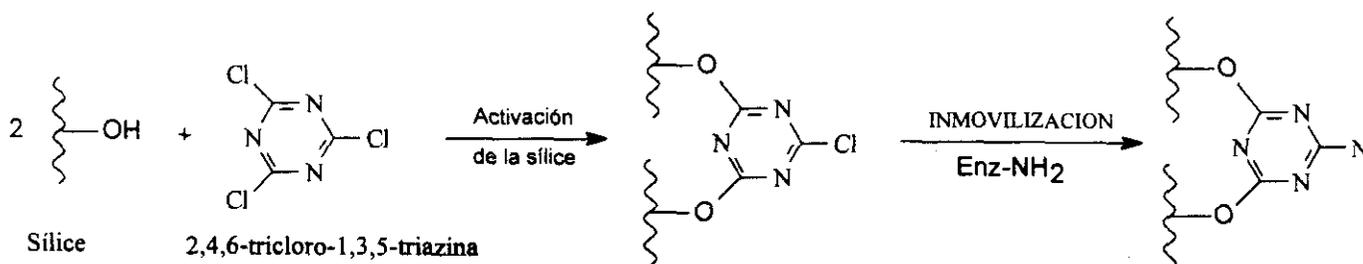
semipurificada. Respecto a la actividad lipásica, se ha producido un aumento del número de recambio (k_{cat}) tras el proceso de semipurificación, debido probablemente a la eliminación de contaminantes interfaciales.

Por último, se analizó la estabilidad de la lipasa semipurificada por precipitación con un 50% de sulfato amónico a 37 y 50°C y se observó la pérdida total de su actividad lipásica a ambas temperaturas, mientras que la lipasa cruda mantiene una actividad remanente. Desde el punto de vista industrial es un inconveniente de gran importancia.

Así pues, en conjunto, se puede considerar que el nuevo biocatalizador obtenido presenta mejores características en las reacciones de hidrólisis de los sustratos estándar que la lipasa cruda, aunque su termoestabilidad es menor.

IV.3.- INMOVILIZACION DE LA LIPASA DE *Rhizomucor miehei*

La lipasa de *Rh.miehei* se inmovilizó por unión covalente a un soporte de sílice (ver II.4.6. y III.5.), previamente activado por el método de la 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (TCT), como muestra el esquema siguiente:



Esquema 25: Inmovilización de la lipasa de *Rh.miehei* por enlace covalente con sílice, previamente activada via TCT

En la presente Tesis Doctoral se siguió este método de inmovilización de la lipasa de *Rh.miehei* por enlace covalente, con el objeto de comparar sus características y actividad con el derivado comercial (Lipozyme® IM20) de lipasa de *Rh.miehei* inmovilizada por adsorción sobre una resina de intercambio aniónico (Duolite-A568).

Como ya se indicó en la Introducción (ver II.4.6.) la inmovilización de enzimas por unión covalente se basa en la activación previa de determinados grupos químicos del soporte, que posteriormente reaccionarán con grupos nucleófilos de la proteína. Los grupos funcionales de las proteínas implicados con mayor frecuencia en este proceso de inmovilización son los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina, situados hacia el exterior de la superficie protéica.

Utilizando la información estructural de la lipasa de *Rh.miehei* depositada por Brady y cols.⁵⁸ en el Banco de Datos de Proteínas se analizó la disposición de los residuos de lisina en la estructura de esta enzima, como se indicó en la Introducción al estudiar la estructura de la lipasa de *Rh.miehei* (ver II.3.3.h; Figura 23).

En la Tabla 34 se indica la posición de estos residuos de lisina en la estructura primaria de la lipasa de *Rh.miehei* y el grado de accesibilidad de cada uno de ellos al disolvente, de acuerdo con la información recogida en la Tabla 4. (ver II.3.3.b.)

Tabla 34: Posición y accesibilidad de los residuos de lisina de la lipasa de *Rh.miehei*.

posición en estructura 1 ^a	grado de accesibilidad (Å)
50	112
53	83
73	10
106	90
109	78
131	144
137	0

Todos los residuos de lisina de la lipasa de *Rh.miehei* se colocan en la zona externa de la proteína debio a su caracter polar, excepto la lisina 137 que está completamente enterrada, lo que permite la unión covalente de esta enzima a la sílice previamente activada. Asimismo, se comprueba que ningún residuo de lisina se coloca en la tapadera y en zonas adyacentes al centro activo, por lo que no se impedirá la normal actividad de la lipasa de *Rh.miehei* tras el proceso de inmovilización por enlace covalente.

Una vez comprobado que la lipasa de *Rh.miehei* no presentaba ningún inconveniente estructural para ser inmovilizada por enlace covalente con sílice se llevó cabo este procedimiento y se inmovilizó la lipasa cruda y semipurificada por precipitación con un 50% de saturación con sulfato amónico (SP). A continuación, se analizó la actividad lipásica de los derivados obtenidos, como catalizadores de la reacción de hidrólisis de tributirina y se estudió su termoestabilidad respecto a la enzima de partida. Asimismo, se comparó la actividad lipásica de estos derivados inmovilizados por unión covalente y el derivado comercial (Lipozyme® IM20) inmovilizado por adsorción.

La nomenclatura utilizada para designar los derivados inmovilizados fue la siguiente:

Cruda → lipasa cruda (Lipozyme® 10000L)

SP → lipasa semipurificada por precipitación con un 50% de saturación de sulfato amónico

IM20 → lipasa inmovilizada por adsorción (Lipozyme® IM20)

SIL-C → lipasa cruda inmovilizada por enlace covalente

SP → lipasa semipurificada por precipitación con un 50% de saturación de sulfato amónico

SIL-SP → lipasa semipurificada e inmovilizada por enlace covalente

IV.3.1.- SEGUIMIENTO DEL PROCESO DE INMOVILIZACION

Durante el proceso de inmovilización se hizo un seguimiento de la concentración de proteínas en el sobrenadante, utilizando el método del biuret y la actividad lipásica específica de dichas proteínas en la reacción de hidrólisis de tributirina (ver II.3.3.b.) con el fin de determinar el tiempo óptimo de inmovilización. En la Figura 55 se representan los resultados obtenidos durante el proceso de inmovilización.

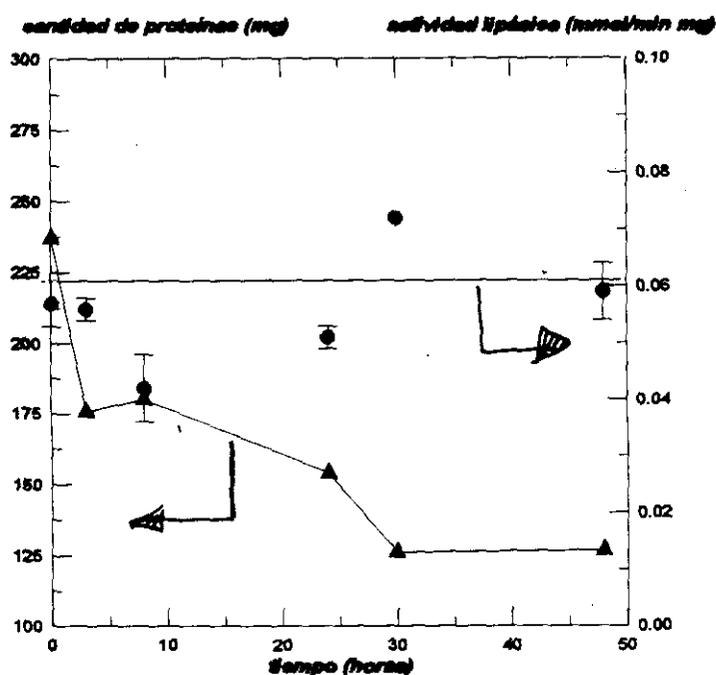


Figura 55: Evolución del proceso de inmovilización de la lipasa de *Rh. miehei* por enlace covalente con sílice activada.

Durante la inmovilización la concentración de proteínas en el sobrenadante fue disminuyendo. A partir de las 30 horas la concentración de proteínas libres se estabilizó

debido a la saturación del soporte, por lo que el proceso de inmovilización se detuvo a las 48 horas, tiempo tras el cual se consideró que ya se habían formado las uniones multipuntuales enzima-soporte.

La actividad específica de las proteínas no inmovilizadas se matuvo constante durante el proceso, lo cual indica que las proteínas que se van uniendo al soporte mantienen toda su actividad y no han sido desnaturalizadas durante el proceso de inmovilización.

En la Tabla 35 se recogen los resultados del proceso de inmovilización.

Tabla 35: Inmovilización de la lipasa de *Rh.miehei* por enlace covalente con sílice, previamente activada con 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (TCT).

soporte (g)	proteína inicial (mg)	carga enzimática (mg prot/mg soporte)	inmovilización (%)	actividad retenida ⁽⁺⁾ (%)
5	237	0,045	96	3,6
11	526	0,028	59	9

(+) actividad retenida específica, referida a la actividad de la lipasa cruda en la reacción de hidrólisis de tributirina.

Al realizar el proceso de inmovilización a mayor escala no se obtuvieron los mismos resultados. El grado de inmovilización, que está determinado por el valor del porcentaje de inmovilización y por la carga enzimática del derivado, fue mayor en el proceso a menor escala, debido a que el volumen de la reacción es menor, lo cual favorece la agregación enzimática y la unión de mayor cantidad de proteínas al soporte. Por el contrario, la actividad retenida del derivado obtenido a pequeña escala es menor, aunque su carga enzimática sea mayor, debido a que la mayor acumulación de proteínas sobre el soporte y su agregación dificulta la accesibilidad del sustrato a los centros activos de la enzima, con lo cual aunque un derivado presente mayor carga enzimática su actividad retenida puede ser menor.

La actividad retenida de los derivados inmovilizados sobre sílice es muy baja si se compara con los resultados obtenidos al inmovilizar la lipasa de *C.cylindracea* comercial según esta metodología (56%)²⁶⁶, ya que ambos derivados presentan cargas enzimáticas semejantes (0,047 mg de lipasa de *C.cylindracea*/mg de soporte). Estos resultados de actividad retenida tan dispares pueden ser debidos a las diferencias estructurales de ambas lipasas

Tabla 36: Propiedades estructurales de las lipasas de *Rh.miehei* y de *C.cylindracea*.

propiedades estructurales	lipasa de <i>Rh.miehei</i>	lipasa de <i>C.cylindracea</i>
peso molecular (kD)	30	62
pto.isoelectrico	4	5,0-5,8
Lisinas	7	17

IV.3.2.- COMPARACION DE LOS DERIVADOS INMOVILIZADOS DE LA LIPASA DE *Rh.miehei*

A continuación se hizo un estudio comparativo de la lipasa de *Rh.miehei* inmovilizada por unión covalente a un soporte de sílice (SIL-C) y el derivado comercial de dicha lipasa inmovilizada por adsorción sobre una resina de intercambio aniónico (Lipozyme® IM20). Lo que permitió comparar la efectividad de diferentes métodos de inmovilización.

La reacción test utilizada para determinar la actividad lipásica de los derivados inmovilizados fue la hidrólisis de tributirina (ver III.3.3.b.).

En la Figura 56 se representan las rectas de actividad lipásica de ambos derivados.

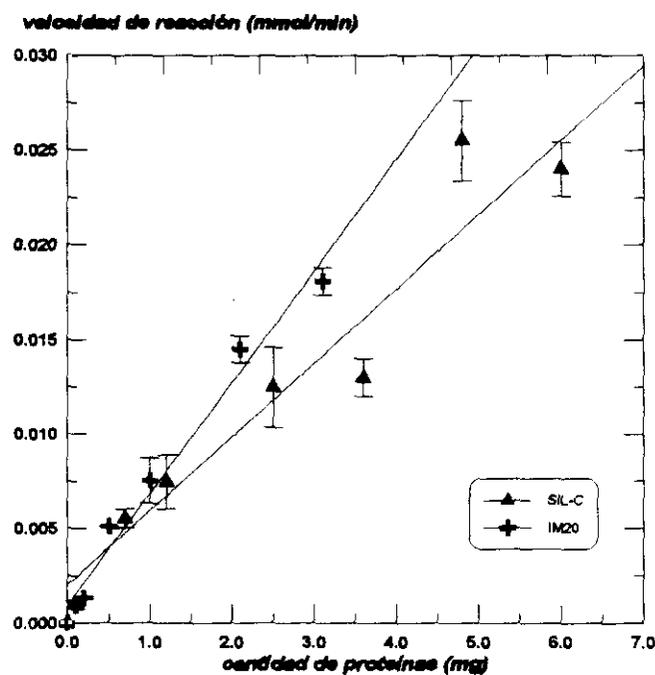


Figura 56: Actividad lipásica de la lipasa de *Rh.miehei* inmovilizada por enlace covalente sobre sílice y por adsorción sobre una resina de intercambio aniónico.

En la Tabla 37 se recogen los valores de las correspondientes pendientes que equivalen a la actividad lipásica específica de cada derivado y que se han representado en la figura anterior.

Tabla 37: Actividad lipásica específica de los derivados inmovilizados de la lipasa de *Rh.miehei* por enlace covalente y por adsorción. Reacción test: **hidrólisis de tributirina**

ENZIMA	actividad lipásica específica (mmol/min mgprot)
Sil-C	$(4,8 \pm 0,3) 10^{-3}$
IM20	$(3,8 \pm 0,4) 10^{-3}$

La actividad lipásica específica del derivado inmovilizado sobre sílice unido por enlace covalente fue superior a la actividad del derivado comercial Lipozyme® IM20, inmovilizado por adsorción a pesar de su menor carga enzimática (carga enzimática de IM20 = 0,12 mg/mg y de Sil-C = 0,028 mg/mg). Este hecho confirma que el derivado obtenido por unión covalente es más estable en medio acuoso que el obtenido por adsorción, ya que el primero no pierde carga enzimática por estar unido covalentemente y el segundo si (*ver. IV.1.1.b.; Tabla 16*).

Determinación de las constantes cinéticas de actividad lipásica

A continuación se determinaron las constantes cinéticas de ambos derivados en la misma reacción de hidrólisis de tributirina, con el fin de analizar la afinidad por el sustrato de estos derivados inmovilizados.

En la Figura 57 se representan las correspondientes curvas de Michaelis-Menten y en la Figura 58 la representación lineal de Eadie-Hofstee.

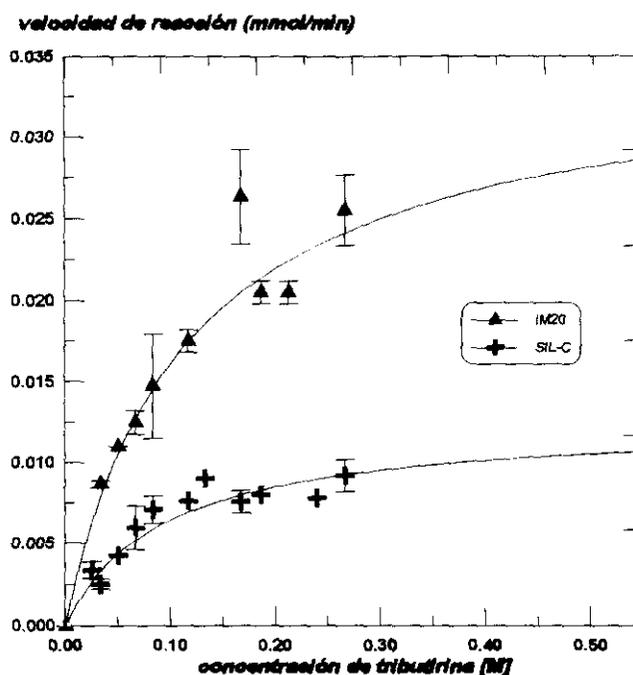


Figura 57: Curvas de Michaelis-Menten de actividad lipásica de la lipasa de *Rh.miehei* inmovilizada por enlace covalente sobre sílice y por adsorción sobre una resina de intercambio aniónico. Reacción test: **hidrólisis de tributirina**.

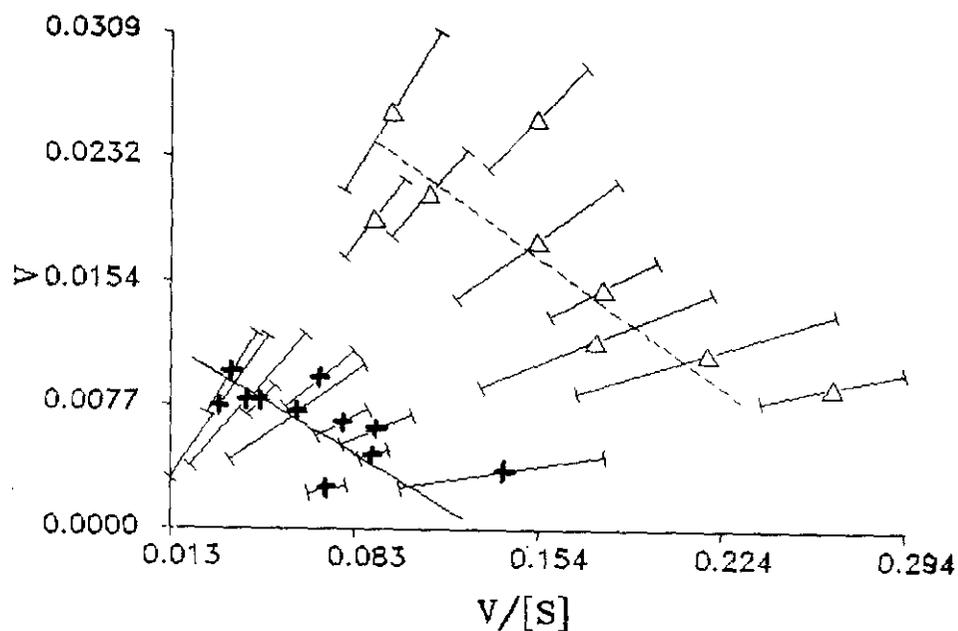


Figura 58: Representación de Eadie-Hofstee de actividad lipásica de la lipasa de *Rh.miehei* inmovilizada por enlace covalente sobre sílice y por adsorción sobre una resina de intercambio aniónico. Reacción test: **hidrólisis de tributirina**.

En la Tabla 38 aparecen los valores de las constantes cinéticas de la reacción de hidrólisis de tributirina catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* inmovilizada por adsorción (IM20) y por enlace covalente (SIL-C)

Tabla 38: Constantes cinéticas de actividad lipásica de los derivados inmovilizados por enlace covalente y por adsorción. Reacción test: **hidrólisis de tributirina.**

ENZIMA	k_M [M]	k_{cat} (mmol/min mgprot)
Sil-C	$(95 \pm 2)10^{-3}$	$(8,9 \pm 1)10^{-3}$
IM20	$(115 \pm 30)10^{-3}$	$(14 \pm 1)10^{-3}$

Los resultados de la Tabla 38 puede deducirse que la inmovilización covalente vía 2,4,6-tricloro-1,3,5,-triazina, llevada a cabo sobre sílice no es distorsionante pues el derivado obtenido presenta unos valores de k_M y k_{cat} semejantes a las del derivado adsorbido (Lipozyme® IM20. Por último, si se comparan estas constantes cinéticas con las correspondientes a la lipasa cruda de *Rh.miehei* (Tabla 23) se observa que la k_M es semejante para ambas enzimas y que el valor de k_{cat} es superior para la lipasa cruda, ya que aunque la afinidad de la lipasa de *Rh.miehei* por la tributirina no varía tras el proceso de inmovilización, la velocidad de reacción si varía.

Así pues, el derivado inmovilizado sobre sílice (SIL-C) puede considerarse mejor biocatalizador que el derivado comercial IM20 en la reacción de hidrólisis de tributirina, puesto que se obtienen resultados semejantes en cuanto a actividad lipásica aunque las cargas enzimáticas son muy diferentes (IM20 (0,12 mg/mg) y SIL-C (0,028 mg/mg), sin que se altere la especificidad de la enzima.

IV.3.3.- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD TERMICA DE LA LIPASA DE *Rh.miehei* INMOVILIZADA SOBRE SILICE

Para analizar la estabilidad de la lipasa de *Rh.miehei* inmovilizada por unión covalente a un soporte de sílice se almacenó dicho derivado a diferentes temperaturas (37 y 50 °C) en un medio de características semejantes al medio de la reacción test de actividad lipásica. La reacción test utilizada para determinar la actividad lipásica remanente del derivado

inmovilizado fue la hidrólisis de tributirina, catalizada por el derivado SIL-C tras un determinado tiempo de almacenamiento en las condiciones indicadas.

La desactivación del derivado inmovilizado se analizó a dos temperaturas diferentes: 37 °C temperatura de la reacción test y a una temperatura externa (50 °C).

Las curvas de desactivación enzimática de la lipasa cruda e inmovilizada (SIL-C) se ajustaron a una ecuación de decrecimiento exponencial simple, como la utilizada en el estudio de la estabilidad térmica de la lipasa de *Rh.miehei* cruda y semipurificada (ver IV.2.3.d.; ecuación 29), mediante el programa EXFIT del paquete integrado SIMFIT versión 4.0²⁵⁴:

$$\text{Actividad residual} = A e^{-kt} + c \quad [29]$$

En las Figuras 59 A y B se comparan las curvas de desactivación de la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada por enlace covalente con sílice (SIL-C) a 37 °C y 50 °C, respectivamente.

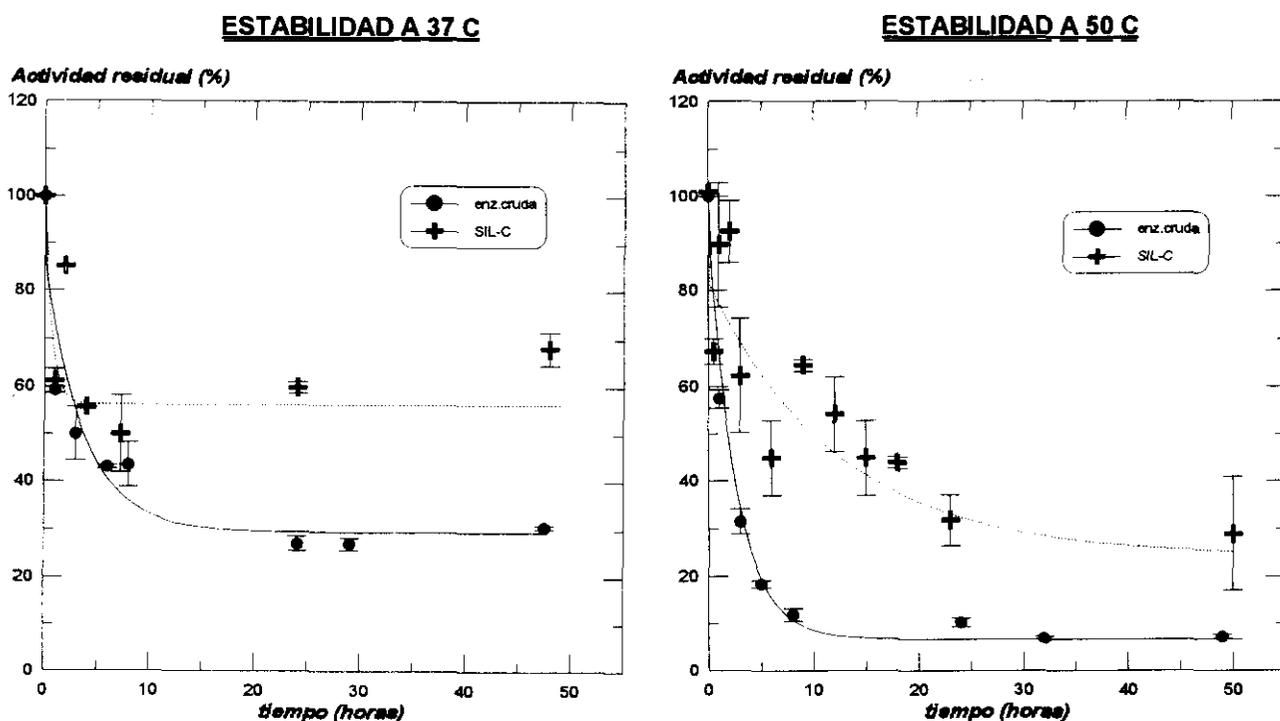
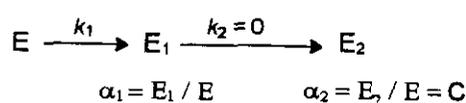


Figura 59: Curvas de desactivación de la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada por unión covalente con sílice (SIL-C). **A)** a 37 °C y **B)** a 50 °C.

Estas curvas de desactivación indican que en todos los casos (a 37 y 50 °C) se alcanza una actividad residual constante (c) y como se indicó en el estudio de estabilidad de la lipasa de *Rh.miehei* semipurificada (SP) (ver IV.2.3.d.) los datos experimentales de la desactivación enzimática para las diferentes temperaturas analizadas se ajustaron a una ecuación de decrecimiento exponencial simple, siguiendo los modelos 3 y 8 descritos por Henley y Sadana²⁷⁵.



Esquema 26: Modelo de desactivación de la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada sobre sílice.

Esto no ocurre con la lipasa de *C.cylindracea*²⁶⁶ inmovilizada sobre sílice, la cual se desactiva siguiendo un modelo lineal, hasta perder toda su actividad.

A partir de los ajustes obtenidos se calcularon los valores de los parámetros de dicha ecuación: constante del ajuste (A), relación de actividades (α_1), constante cinética de desactivación (k_1) y actividad remanente ($c = \alpha_2$), que aparecen en la Tabla 39.

Tabla 39: Parámetros de desactivación enzimática a 25, 37 y 50 °C de la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada sobre sílice.

ENZIMA	T (°C)	A (%)	α_1 (%)	k (h ⁻¹)	α_2 (%)
cruda	50	88±7	12±0,9	0,38±0,03	6,6±0,4
Sil-C	50	57±6	43±4	0,08±0,02	24±4
cruda	37	57±5	43±3	0,27±0,05	29±2
Sil-C	37	42±7	58±9	1,5±0,6	56±2

La diferencia entre ambas enzimas reside en el hecho de que los estados intermedios de desactivación (E_1 y E_2) de la enzima inmovilizada son más activos, ya que los parámetros

de actividad relativa (α_1 y α_2) son mayores. Evidentemente, cuanto mayor es la temperatura de almacenamiento, menor es la actividad residual ($c = \alpha_2$), ya que está más próxima a la temperatura de desnaturalización enzimática.

Los resultados más destacados, en cuanto al incremento de la estabilidad enzimática tras el proceso de inmovilización se observan a 50 °C, ya que a esa temperatura las diferencias entre los valores de las actividades relativas (α_1) y las actividades remanentes (α_2) son más acusadas.

Tras analizar todos los parámetros de la ecuación monoexponencial decreciente a la cual se ajustó el proceso de desactivación enzimática de los biocatalizadores estudiados se comprobó que se había logrado el objetivo fundamental del proceso de inmovilización, que es el aumento de la estabilidad de la enzima, ya que en ambos casos (37 y 50 °C) la actividad residual remanente fue significativamente superior para el derivado inmovilizado (SIL-C).

Por tanto, se puede concluir que tanto la lipasa cruda de *Rh.miehei* como la inmovilizada sobre sílice por unión covalente (SIL-C) siguen el mismo modelo de desactivación (Esquema 26), de lo que se deduce que el procedimiento de inmovilización seguido no provoca distorsiones en la lipasa de *Rh.miehei*, tal y como cabría preveer teniendo en cuenta la ubicación de los residuos de lisina por los cuales se produce la unión covalente soporte-enzima, los cuales se sitúan alejados del centro activo de la lipasa de *Rh.miehei* (ver II.3.3.h.; Figura 23)

IV.3.4.- INMOVILIZACION DE LA LIPASA DE *Rh.miehei* SEMIPURIFICADA

Como ya se indicó en la Sección IV.2. de la presente Memoria, tras llevar a cabo diversos métodos de semipurificación de la lipasa de *Rh.miehei*, se determinó que el método de semipurificación por precipitación con un 50% de saturación de sulfato amónico era el más adecuado. Aunque la lipasa semipurificada por ese procedimiento resultó ser más activa que la lipasa cruda, su estabilidad fue peor (ver IV.2.3.d.), por lo que se procedió a inmovilizarla, con el fin de incrementar su estabilidad y poder así utilizarla a nivel industrial.

La lipasa de *Rh.miehei* se semipurificó a mayor escala siguiendo esa metodología y posteriormente se inmovilizó por enlace covalente con sílice, previamente activada vía 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (TCT).

Inmovilización de la lipasa de *Rh.miehei*

En la Tabla 40 se comparan los resultados obtenidos al inmovilizar la lipasa de *Rh.miehei* cruda y semipurificada.

Tabla 40: Inmovilización por enlace covalente con sílice, de la lipasa de *Rh.miehei* cruda (SIL-C) y semipurificada por precipitación con un 50% de saturación de sulfato amónico (SIL-SP).

ENZIM	soporte (g)	prot.inicia (mg)	carga enz. (mg prot /mg soporte)	inmov. (%)	actividad retenida ⁽⁺⁾ (%)
Sil-C	5	237	0,045	96	3,6
	11	526	0,028	59	9
Sil-SP	2,2	10	0,0013	28,6	12,5

(+) actividad retenida específica, referida a la actividad de la lipasa cruda en la reacción de **hidrólisis de tributirina**.

El porcentaje de actividad retenida se determinó analizando la actividad lipásica específica de las lipasas, cruda y semipurificada, antes y después de la inmovilización. La reacción de referencia fue la hidrólisis de tributirina.

Puede observarse que el rendimiento del proceso de inmovilización de la lipasa semipurificada es menor que el de la lipasa cruda, aunque la actividad lipásica retenida es mayor, tal y como cabía esperar al inmovilizar una enzima más pura y más activa.

Actividad lipásica específica

En la Figura 60 se representa la actividad lipásica de los derivados inmovilizados por enlace covalente con sílice en la reacción de hidrólisis de tributirina.

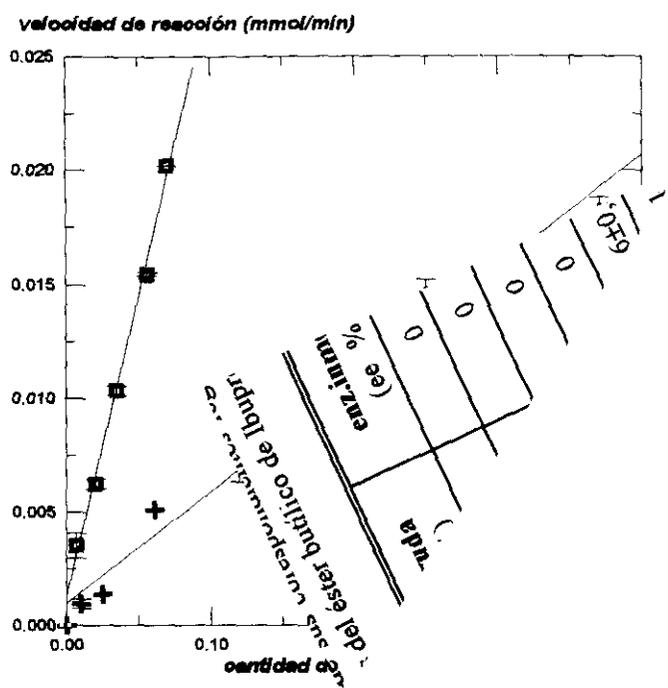


Figura 60: Actividad lipásica de la lipasa de *Rh.miehei* cruda y semipurificada, inmovilizadas ambas sobre sílice. Reacción test: **hidrólisis de tributirina**.

En la Tabla 41 aparecen los valores de actividad lipásica específica de ambas enzimas (cruda y semipurificada) inmovilizadas por enlace covalente. Estos valores de actividad específica corresponden a la pendiente de las rectas representadas en la Figura 60.

La actividad lipásica específica indica el valor de actividad lipásica por miligramo de proteína, determinado por el método de Bradford, por lo que el valor de actividad de la lipasa cruda (inmovilizada y no inmovilizada) se multiplicó por el factor de corrección ($8,5 \pm 0,9$).

Tabla 41: Actividad lipásica específica de la lipasa de *Rh.miehei* cruda y semipurificada e inmovilizadas sobre sílice. Reacción test: **hidrólisis de tributirina**.

ENZIMA	actividad lipásica específica (mmol/min mgprot)
cruda	$0,75 \pm 0,03$ (*)
Sil-C	$(4,1 \pm 0,2) 10^{-2}$ (*)
SP	$2,0 \pm 0,1$
Sil-SP	$0,25 \pm 0,001$

(*) se aplicó el factor de corrección ($f=8,5 \pm 0,9$) para expresar la cantidad de proteína según el método de Bradford.

Tras el estudio comparativo de la actividad lipásica de los derivados inmovilizados de la lipasa cruda y semipurificada se confirma que el derivado semipurificado es más activo, como se esperaba, puesto que la enzima de partida era más activa y la actividad retenida del derivado es también superior.

Determinación de las constantes cinéticas

A continuación se determinaron las constantes cinéticas de la actividad lipásica de ambos derivados en la reacción de hidrólisis de tributirina con el fin de analizar su comportamiento cinético y su afinidad por el sustrato tributirina.

En la Figura 61 las curvas de Michaelis-Menten, linealizadas en la Figura 62 mediante el modelo de Eadie-Hofstee.

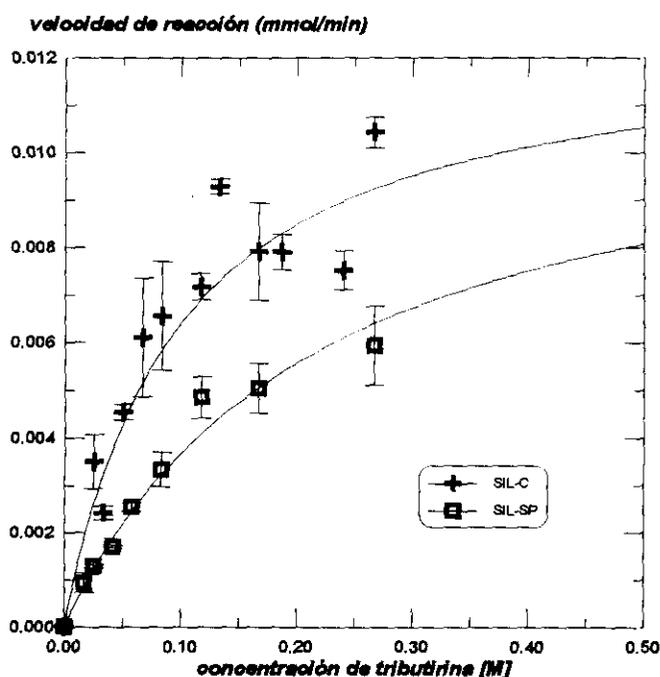


Figura 61: Curvas de Michaelis-Menten de actividad lipásica de la lipasa de *Rh.miehei* cruda y semipurificada, inmovilizadas sobre sílice. Reacción test: **hidrólisis de tributirina**

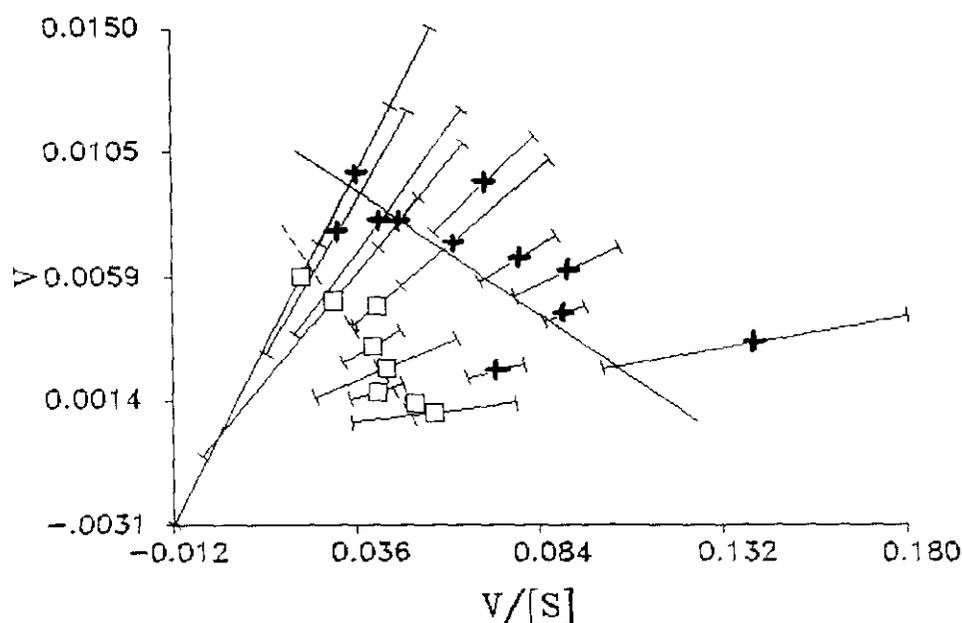


Figura 62: Representación de Eadie-Hofstee de actividad lipásica de la lipasa de *Rh.miehei* cruda y semipurificada, inmovilizadas sobre sílice. Reacción test: **hidrólisis de tributirina**.

En la Tabla 42 se recogen los valores las constantes cinéticas de la reacción de hidrólisis de tributirina, catalizada por los derivados inmovilizados sobre sílice de la lipasa cruda (SIL-C) y semipurificada (SIL-SP) de *Rh.miehei*.

Tabla 42: Constantes cinéticas de actividad lipásica de los derivados inmovilizados sobre sílice de la lipasa cruda y semipurificada de *Rh.miehei*. Reacción test: **hidrólisis de tributirina**.

ENZIMA	K_M [M]	k_{cat} (mmol/min mgprot)
Sil-C	$(95 \pm 2)10^{-3}$	$(75 \pm 8)10^{-3} (*)$
Sil-SP	$(210 \pm 50)10^{-3}$	$0,5 \pm 0,1$

(*) se aplicó el factor de corrección ($f=8,5 \pm 0,9$) para expresar la cantidad de proteína según el método de Bradford.

Al comparar los valores de las constantes cinéticas (K_M y k_{cat}) para ambos derivados, se observa que las constantes del derivado SIL-SP son mayores y que el aumento más importante se produce en la constante catalítica (k_{cat}), la cual incrementa en seis veces su

valor, mientras que K_M experimenta un aumento del doble de su valor. Por otra parte, comparando estos resultados con los obtenidos con las lipasas no inmovilizadas (*Tabla 32*) se observa que el valor de K_M no varía tras la inmovilización de la lipasa cruda (K_M de la enzima cruda = 0,06M y K_M de SIL-C = 0,09M), mientras que aumenta notablemente para el derivado SIL-SP (K_M de SP = 0,06M y K_M de SIL-SP = 0,21M). Esta diferencia en la evolución del valor de K_M tras la inmovilización de estas enzimas puede ser debido a la eliminación de los azúcares y pequeños péptidos que contaminan la preparación comercial, por lo que al inmovilizar la enzima semipurificada la formación de la interfase necesaria para el reconocimiento del sustrato se modifica, fenómeno que se traduce en un aumento del valor de K_M de SIL-SP.

Asimismo, se puede considerar el hecho de que al inmovilizar la lipasa cruda y debido a la gran cantidad de moléculas de glúcidos que acompañan a la proteína, es factible que se origine cierta competencia entre las lisinas de la proteína y los grupos hidroxilo de los azúcares por unirse a los puntos activados del soporte (sílice activada vía TCT), de forma que la inmovilización de la lipasa cruda se podría producir a través de los azúcares, dando lugar a un derivado (SIL-C) similar al obtenido por adsorción, pues el centro activo no es modificado. Sin embargo, en el caso de la enzima semipurificada, al estar desprovista de azúcares, la unión covalente al soporte activado se produce únicamente a través de sus residuos de lisina, por lo que se podría alterar más fácilmente el centro activo de la lipasa, modificación que se traduce en un aumento del valor de la constante de afinidad (K_M) del derivado SIL-SP respecto de la enzima SP, pero que a su vez también provoca un aumento de k_{cat} .

IV.3.4.a.- Estudio de la estabilidad térmica de la lipasa de *Rh.miehei* semipurificada e inmovilizada sobre sílice (SIL-SP)

Una vez comprobado el incremento de la actividad de la lipasa semipurificada de *Rh.miehei* tras el proceso de inmovilización, se procedió al estudio de la estabilidad de dicho derivado a 37 y 50 °C, tras un período de almacenamiento a dichas temperaturas en un medio semejante al de la reacción de hidrólisis de tributirina, reacción de referencia para el estudio de la evolución de la desactivación enzimática.

comparativo de la termoestabilidad de la lipasa de *Rh.miehei* y de todos sus derivados obtenidos a lo largo de la presente Tesis Doctoral. Los valores correspondientes a los parámetros de la ecuación de desactivación enzimática para la lipasa de *Rh.miehei* cruda, semipurificada (SP) e inmovilizada por enlace covalente sobre sílice, tanto cruda (SIL-C) como semipurificada (SIL-SP) se recogen en la Tabla 43.

Tabla 43: Parámetros de desactivación enzimática a 37 y 50 °C de la lipasa de *Rh.miehei* semipurificada e inmovilizada sobre sílice (Sil-SP); la lipasa cruda y la lipasa cruda inmovilizada sobre sílice (Sil-II)

ENZIMA	T* (°C)	A (%)	α_1 (%)	k (h ⁻¹)	c = α_2 (%)
CRUDA	37	57±5	43±4	0,27±0,05	29±2
SP	37	94±4	6,1±0,2	0,042±0,004	0
Sil-C	37	42±7	58±9	1,5±0,6	56±2
Sil-SP	37	52±33	48±3	0,16±0,01	48±3
CRUDA	50	88±7	12±1	0,38±0,03	6,6±0,4
SP	50	96±2	4,0±0,1	0,27±0,02	0
Sil-C	50	57±6	43±4	0,08±0,02	24±4
Sil-SP	50	38±3	62±4	0,10±0,03	57±2

Tras el análisis de los datos de la Tabla 43 se llegó a la conclusión de que tras la inmovilización de la lipasa semipurificada de *Rh.miehei* (SIL-SP) se incrementó notablemente la estabilidad de dicha enzima con respecto a la lipasa semipurificada (SP) y con respecto al derivado SIL-C, obtenido al inmovilizar la lipasa cruda. Con el derivado SIL-SP se obtuvieron los mayores valores de actividad remanente (α_2) a las dos temperaturas estudiadas. El incremento de la estabilidad es más notable a 50 °C, ya que a elevadas temperaturas el proceso de desactivación enzimática es también mayor, por lo que la diferencia de la constante de desactivación (k) de la lipasa semipurificada e inmovilizada sobre sílice con respecto a la constante de desactivación de las otras enzimas es más marcada, que a 37 °C.

En conclusión, el proceso de inmovilización por enlace covalente con sílice, previamente activada vía TCT, es un magnífico sistema de estabilización de la lipasa de

Rh.miehei, puesto que los derivados obtenidos resultaron ser mucho más estables, siendo esta diferencia más notable a elevadas temperaturas. Además, se ha logrado el objetivo principal de la inmovilización de la lipasa semipurificada, que era el incremento de su estabilidad, por lo que se solventó el inconveniente planteado para la aplicación, desde el punto de vista industrial, de esta enzima semipurificada que aunque es más activa que la lipasa cruda, resultó ser muy poco estable. Por todo ello este nuevo derivado de la lipasa de *Rh.miehei* semipurificada e inmovilizada, es un biocatalizador óptimo para su utilización industrial en procesos de hidrólisis.

IV.4.- RESOLUCION ENANTIOSELECTIVA DE AINEs

Como se indicó en la Introducción de esta Memoria (*ver II.2.7.c.1.*) uno de los objetivos actuales de la Industria farmacéutica es la obtención de fármacos homoquirales. En la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la resolución enantioselectiva de mezclas racémicas de ácidos (R,S) 2-arilpropiónicos o de sus ésteres correspondientes, utilizando como biocatalizador la lipasa de *Rh.miehei*. Asimismo, se ha analizado con detalle la influencia de las diversas variables que intervienen en la reacción y que pueden modificar el rendimiento y el grado de enantioselectividad de la misma.

Las estrategias seguidas fueron dos:

- 1).- **Hidrólisis enantioselectiva** en medio acuoso, a partir del correspondiente éster racémico.

- 2).- **Esterificación enantioselectiva**, a partir del ácido racémico, mediante reacciones de esterificación en medio orgánico.

IV.4.1.- ENANTIOSELECTIVIDAD DE LA LIPASA DE *Rh.miehei*

En la bibliografía se recoge diversa información acerca de la enantioselectividad de la lipasa de *Rh.miehei*. Algunos autores han trabajado con ácidos quirales, obteniendo resultados dispares acerca de la enantiopreferencia de esta enzima, mientras que los que se han centrado en el estudio de alcoholes quirales han obtenido resultados más homogéneos.

Entre los trabajos realizados con ácidos quirales se encuentran los realizados por Sih y cols.^{240,246}, los cuales observaron que en la reacción de hidrólisis del éster metílico del (R,S) Naproxeno, la lipasa de *R.miehei* suministrada por el laboratorio Amano actuaba, preferentemente, sobre el enantiómero R de dicho éster, coincidiendo con lo indicado por Palomer y cols.^{247,276} en las reacciones de hidrólisis y transesterificación del Ketoprofeno, utilizando la lipasa de *Rh.miehei* suministrada por los laboratorios Amano y Novo-Nordisk. Por el contrario, Mustranta²⁴² observó una enantiopreferencia opuesta, hacia el enantiómero S, en la reacción de esterificación del (R,S) Ibuprofeno con alcohol amílico. Esta misma enantiopreferencia de la lipasa de *Rh.miehei* se observó en la reacción de esterificación de

(R,S) Ibuprofeno con 1-propanol, trabajando en condiciones supercríticas utilizando anhídrido carbónico como disolvente²⁴¹. Estos dos últimos autores utilizaron la lipasa suministrada por el laboratorio Novo-Nordisk.

Otros autores han llevado a cabo reacciones enantioselectiva de esterificación^{277a} y de transesterificación^{277b} utilizando alcoholes quirales y como catalizador la lipasa de *Rh.miehei* de Novo-Nordisk, observando en todos los casos una enantiopreferencia hacia el estereoisómero R, aunque con diferente grado de enantioselectividad según fuera la naturaleza del alcohol estudiado, debido a la formación de un complejo acil-enzima, característico para cada ácido, cuya estructura y orientación influye directamente en el proceso de aproximación posterior de los enantiómeros del alcohol^{277b}, favoreciendo de esta forma la esterificación con un determinado isómero del alcohol.

Estos resultados dispares difícilmente pueden atribuirse al efecto de variables aquirales, como las que constituyen el medio de reacción; sino que lo más probable es que sea debido al distinto origen y/o grado de purificación de las preparaciones enzimáticas comerciales. Como ya se ha indicado, en las reacciones llevadas a cabo por los autores antes citados se utilizaron lipasas de *Rh.miehei* procedentes de distintos laboratorios (Novo-Nordisk y Amano). El diferente origen de la preparación enzimática puede ser un factor importante en la modificación de la enantiopreferencia de esta lipasa, ya que como observó Sonnet^{277c} **el grado de enantiopreferencia de la lipasa de *Rh.miehei* en la reacción de esterificación de ácido octanóico con (±) 2-octanol en hexano, varía según el laboratorio suministrador de la enzima**; así la lipasa de Novo-Nordisk presentaba una gran enantioselectividad, la lipasa de Gist Brocades una enantioselectividad media y la lipasa de Amano una enantioselectividad muy pobre.

IV.5.- HIDROLISIS ENANTIOSELECTIVA DE ESTERES DE ACIDOS (R,S) 2-ARILPROPIONICOS

Con el objeto de obtener el enantiómero farmacológicamente activo (S(+)) de los AINES derivados del ácidos (R,S) 2-arylpropiónico y de acuerdo con la información recogida en la bibliografía, acerca de la enantiopreferencia de la lipasa de *Rh.miehei* del laboratorio

Novo-Nordisk; se planteó como primera estrategia el desarrollo de la reacción de hidrólisis enantioselectiva de los ésteres racémicos de dichos ácidos.

Como sustratos de esta reacción se emplearon los ésteres butílicos de los ácidos (R,S) 2-arilpropiónicos. La reacción de hidrólisis de dichos ésteres fue catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* nativa (Lipozyme® 10000L) e inmovilizada por adsorción sobre una resina de intercambio aniónico (Lipozyme® IM20) en medio acuoso a pH neutro, 37°C y 143 horas de reacción, según el método B de hidrólisis enzimática de ésteres descrito en la Parte Experimental de esta Memoria (ver III.7.2.)

Los rendimientos de la reacción (expresada en porcentaje de ácido liberado) y la enantioselectividad del ácido liberado (expresado en exceso enantiomérico (ee); así como el valor del coeficiente enantiomérico (E) (ver II.2.5.b.1.) aparecen en la Tabla 44.

Tabla 44: Resultados de la hidrólisis de los ésteres butílicos de los ácidos (R,S) 2-arilpropiónicos catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* (143 h).

éster butílico de	enzima	rend. (%)	ee (%)	E
IBUPROFENO	cruda	13,6±0,6	9,0±0,3 (S)	1,2
	IM20	56±2	3,0±0,1 (S)	1,1
2-FENILPROPIÓNICO	cruda	20,1±0,4	51±2 (S)	3,5
	IM20	98,6±0,1	27±1 (S)	>50
NAPROXENO	cruda	67±9	30±1 (S)	3,2
	IM20	0	---	---
KETOPROFENO	cruda	56±4	61±2 (R)	9,4
	IM20	77±1	57±2 (R)	>50

Las reacciones de hidrólisis de los ésteres butílicos de los ácidos (R,S) 2-arilpropiónicos presentaron numerosos e importantes problemas técnicos. La formación y mantenimiento de la emulsión fue muy difícil, por lo que las reacciones fueron muy poco reproducibles, obteniéndose resultados muy dispares en los numerosos ensayos realizados. Asimismo, no es aconsejable la utilización de la lipasa inmovilizada (Lipozyme® IM20) en medio acuoso, de acuerdo con los resultados obtenidos en los estudios de su actividad lipásica

(ver IV.1.2.) y los estudios de desorción (ver IV.1.1.b.). El elevado rendimiento obtenido con esta enzima inmovilizada puede ser consecuencia de la desorción de la proteína de este derivado tras 143 h de reacción y de la actuación de la lipasa desorbida, por lo que será muy difícil controlar el desarrollo de la reacción y determinar la influencia del proceso de desorción en el rendimiento de la reacción de hidrólisis.

Aunque la enantioselectividad de estas reacciones era la deseada, obteniéndose el ácido S(+) farmacológicamente activo, (excepto con el Ketoprofeno), debido a los importantes inconvenientes técnicos de esta reacción de hidrólisis y su difícil reproducibilidad se varió la estrategia seguida y se llevó a cabo la reacción inversa de síntesis enantioselectiva de los correspondientes ésteres en medio orgánico.

IV.5.1.- ACTIVIDAD DE LA LIPASA DE *Rh.miehei* SEMIPURIFICADA E INMOVILIZADA.

Utilizando como reacción de referencia la hidrólisis del éster butílico de (R,S) Ibuprofeno a pH=8, 37 °C y 143 min. se analizó la actividad hidrolítica de la lipasa de *Rh.miehei* inmovilizada por unión covalente con sílice (SIL-C) y esta misma lipasa semipurificada por precipitación con un 50% de saturación con sulfato amónico y posteriormente inmovilizada por el mismo método (SIL-SP).

Para poder comparar la actividad hidrolítica de dichas enzimas se determinó la actividad específica (mmol ácido liberado/min mg proteína determinadas por el método de Bradford) de cada una de ellas. En la Tabla 45 se recogen los resultados de rendimiento (mmol ácido/min mg proteína) y exceso enantiomérico (ee) obtenidos con cada lipasa.

Tabla 45: Actividad de la lipasa de *Rh.miehei* cruda, semipurificada e inmovilizada por adsorción y por unión covalente covalente con sílice en la reacción de hidrólisis enantioselectiva del éster butílico de Ibuprofeno (143 h)

ENZIMA	activ.especif (mmol/mgprot)	ee _{ácido} (%)	E
cruda	0,126±0,003	7,1±0,3 (S)	1,19
SP	2,98±0,08	60±2 (S)	>50
IM20	0,028±0,002	37±5 (S)	>50
SIL-C	1,25±0,01	78±3 (S)	>50
SIL-SP	0,29±0,003	52±2 (S)	>50

Como se indicó anteriormente, al semipurificar la lipasa de *Rh.miehei* por precipitación con un 50% de saturación de sulfato amónico (SP), se obtuvo una lipasa de mayor actividad esterásica (ver IV.2.3.c.; Tabla 28) y lipásica (ver IV.2.3.d.; Tablas 30 y 31) en las reacciones de hidrólisis de sus sustratos específicos (acetato de *p*-nitrofenilo, aceite de oliva y tributirina). Asimismo, la actividad de esta lipasa semipurificada en la reacción de hidrólisis de otro sustrato no específico como es el éster butílico de Ibuprofeno también aumentó, como se observa en los resultados de la Tabla 45. Además la enantioselectividad del proceso aumentó tras la semipurificación de la lipasa de *Rh.miehei*, coincidiendo con lo observado por Moreno y cols.²⁶⁶ con la lipasa purificada de *C.cylindracea* en la reacción de hidrólisis del éster propílico de 2-fenilpropiónico. Todos estos resultados indican que, efectivamente, el biocatalizador ha mejorado notablemente tras el proceso de semipurificación.

Al inmovilizar la lipasa cruda de *Rh.miehei* por enlace covalente con sílice (derivado SIL-C) aumentó el rendimiento. Este aumento del rendimiento puede atribuirse a la estabilización de la emulsión por efecto de la superficie del soporte, cargada electrostáticamente. Este resultado es opuesto al observado en la reacción de hidrólisis de tributirina (ver Tabla 41), ya que en ese caso el derivado SIL-C resultó ser menos activo que la lipasa cruda. Quizá ese comportamiento diferente se deba a que en la reacción de hidrólisis de tributirina se solventó el principal inconveniente de las reacciones de hidrólisis, la formación correcta de la emulsión, por la adición de un agente emulsificante (goma arábiga), pudiéndose medir la actividad hidrolítica sin la influencia de factores externos o dificultades técnicas.

Tras la inmovilización de la lipasa de *Rh.miehei* por adsorción (IM20) o por unión covalente (SIL-C y SIL-SP) se obtuvieron una serie de derivados de gran enantioselectividad, debido probablemente a la alteración de la conformación de la enzima, ya que disminuyen sus grados de libertad, aumentando su rigidez y por tanto su enantioselectividad hacia el isómero S, que es el enantiómero sobre el que trabaja la lipasa cruda de *Rh.miehei* (Lipozyme® 10000L).

Al comparar la actividad hidrolítica del derivado inmovilizado por adsorción (Lipozyme® IM20) ($0,028 \pm 0,002$ mmol/min mg) y del derivado inmovilizado covalentemente (SIL-C) ($1,25 \pm 0,01$ mmol/min mg) se obtienen resultados muy superiores con el derivado inmovilizado sobre sílice, como ya ocurrió en la reacción de hidrólisis de tributirina (ver IV.1.3.b.; Tabla 22). Este resultado era de esperar, pues el derivado Lipozyme® IM20 no es muy adecuado para catalizar reacciones en medio acuoso, ya que fue diseñado para reacciones en medio orgánico^{276,277}.

Tras comparar entre sí la actividad hidrolítica de todos los preparados enzimáticos utilizados (semipurificados, inmovilizados por adsorción y covalentemente) (Tabla 45) se llegó a la conclusión de que la preparación más indicada para llevar a cabo la reacción de hidrólisis del éster butílico de Ibuprofeno es la lipasa semipurificada por precipitación con sulfato amónico (SP).

IV.6.-SINTESIS ENANTIOSELECTIVA DE ESTERES DE ACIDOS (R,S) 2-ARILPROPIONICOS

Otra metodología seguida para la resolución enzimática de las mezclas racémicas de AINEs derivados del ácido (R,S) 2-arilpropiónico se basó en la síntesis enantioselectiva de los ésteres correspondientes. Dicha metodología permitió además, analizar el comportamiento de la lipasa de *Rh.miehei* en medio orgánico.

El estudio de estas reacciones se estructuró en los siguientes apartados:

- 1).- estudio de la influencia de las variables de operación.
- 2).- estudio de la influencia de las variables discontinuas o estructurales.

Para llevar a cabo todos estos estudios se estableció una **reacción estándar de síntesis de ésteres** con las siguientes características:

ácido → (R,S) Ibuprofeno (0,125 M)

alcohol → 1-butanol

disolvente → ciclohexano (10 ml)

lipasa cruda de *Rh.miehei* (Lipozyme® 10000L)(0,4 ml)

lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* (Lipozyme®IM20)(300 mg)

temperatura → (37 °C)

tiempo de reacción → (72 h)

El análisis del rendimiento de reacción y del exceso enantiomérico se describe en la Parte Experimental de esta Memoria (*ver III.8.3.*).

IV.6.1.- ESTUDIO DE LAS VARIABLES DE OPERACION.

DISEÑO ESTADISTICO DE EXPERIMENTOS

Para estudiar las variables de operación que pueden influir en la reacción de síntesis del éster butílico de (R,S) Ibuprofeno en ciclohexano, catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* tanto libre como inmovilizada, se utilizó un analisis factorial denominado Diseño estadístico de Experimentos, que es un método de variación múltiple en el cual, todos los parámetros objeto de estudio varían simultáneamente de forma programada. De este modo se realiza un

estudio eficiente y racional de las variables elegidas en todo su intervalo y se obtiene información adicional de los efectos debidos al conjunto de dos o más variables²⁶⁸.

Esta metodología ya fue empleada por García y cols.²⁷⁸ para analizar la influencia de las variables (temperatura, presión y concentración de catalizador) en la síntesis del oleato de oleilo, catalizada por la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* (Lipozyme® IM20).

En la presente Tesis Doctoral se analizaron más variables y se compararon las actividades de la lipasa cruda e inmovilizada de *Rh.miehei*.

IV.6.1.a.- Lipasa cruda de *Rh.miehei* (Lipozyme® 10000L)

Las variables consideradas fueron:

relación molar (ácido:alcohol)(X_A)

tiempo reacción (h) (X_B)

temperatura (°C) (X_C)

velocidad agitación (r.p.m.) (X_D)

enzima libre (ml) (X_E)

disolvente (ml) (X_F)

Los valores máximo, mínimo y central para cada una de estas variables aparecen en la Tabla 46.

Tabla 46: Variables y valores considerados en el Diseño estadístico de Experimentos para la lipasa cruda de *Rh.miehei*.

VARIABLES	(+)	P.C.	(-)
relación ácido:alcohol(X_A)	4:1	1:1	1:4
tiempo reacción (X_B)	10 h	8 h	6 h
temperatura (X_C)	57 °C	37 °C	17 °C
velocidad agitación (X_D)	700 rpm	500 rpm	300 rpm
enzima libre (X_E)	1,6 ml	1 ml	0,4 ml
disolvente (X_F)	15 ml	10 ml	5 ml

Los experimentos fueron realizados de forma aleatoria según un modelo factorial de 2^3 . En total se realizaron 16 experimentos combinando de forma aleatoria los valores máximos

y mínimos de cada variable y 3 experimentos con el valor central (C.P.) de cada variable. En la Tabla 47 se muestran los valores máximos y mínimos de cada variable para cada experimento, así como el rendimiento de cada reacción, expresado en porcentaje de éster producido.

Tabla 47: Diseño factorial: Matriz experimental para la lipasa cruda de *Rh.miehei*.

Exp	X _A	X _B	X _C	X _D	X _E	X _F	Y(%)
1	-	-	-	-	-	-	1,94
2	+	-	-	-	+	-	3,55
3	-	+	-	-	+	+	14,43
4	+	+	-	-	-	+	0
5	-	-	+	-	+	+	0
6	+	-	+	-	-	+	0
7	-	+	+	-	-	-	0
8	+	+	+	-	+	-	19,13
9	-	-	-	+	-	+	0
10	+	-	-	+	+	+	1,57
11	-	+	-	+	+	-	15,82
12	+	+	-	+	-	-	0
13	-	-	+	+	+	-	5
14	+	-	+	+	-	-	3,79
15	-	+	+	+	-	+	5,03
16	+	+	+	+	+	+	14,62
17	0	0	0	0	0	0	49,96
18	0	0	0	0	0	0	54,44
19	0	0	0	0	0	0	59,61

A continuación, se realizó un análisis estadístico utilizando el programa STATGRAPH²⁶⁹. Los valores de los coeficientes estimados para cada variable obtenidos tras dicho análisis estadístico se recogen en la Tabla 48. Estos coeficientes se compararon con el error experimental obtenido, equivalente a la desviación estándar de los resultados de las tres reacciones realizadas con los valores medios de cada variable. Generalmente cuanto mayores son los valores de los coeficientes en relación con el valor de desviación estándar, mayor es la influencia de las variables sobre el rendimiento de la reacción²⁷⁹.

Tabla 48: Análisis estadístico del Diseño de Experimentos realizado para la lipasa cruda de *Rh.miehei*.

Número de experimentos: 16

Grados de libertad: 15

Resultados del análisis estadístico:

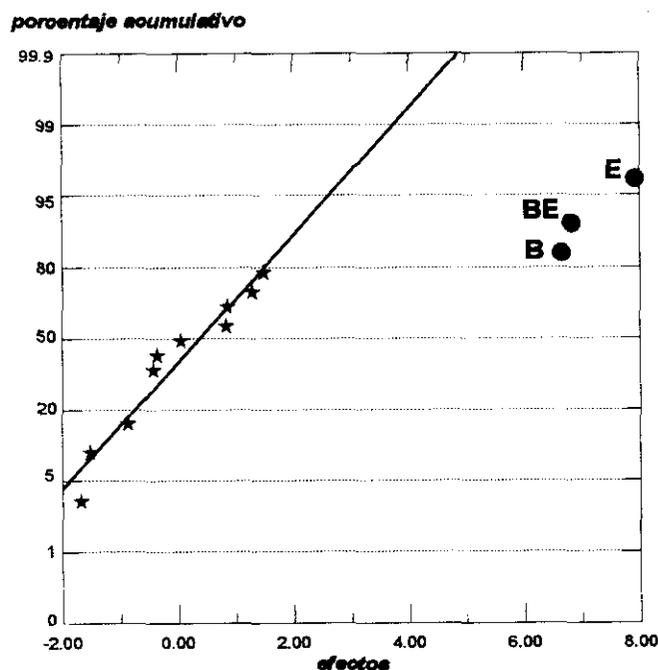
$$\begin{array}{ll}
 b_0 = 5,30 & b_{AB} = b_{CE} = -0,43 \\
 b_A = 0,05 & b_{AC} = b_{BE} = 6,82 \\
 b_B = 6,64 & b_{BC} = b_{AE} = b_{DF} = 0,85 \\
 b_C = 1,28 & b_{AD} = b_{EF} = -1,52 \\
 b_D = 0,84 & b_{BD} = b_{CF} = -0,37 \\
 b_E = 7,92 & b_{CD} = b_{BF} = 1,48 \\
 b_F = -1,69 & b_{DE} = b_{AF} = -0,87
 \end{array}$$

Análisis del punto central (t de Student)

nivel de confianza: 95 %

 $C_m = 54,7 \%$ $t_2 (\alpha=0,05) = 2,9$ $S_x = 4,8$ límites de confianza: $\pm 10,0$

Asimismo, se analizó la influencia de cada variable en la reacción a través del método de Daniels²⁸⁰ (Figura 64). Según esta metodología los puntos que no se ajustan al modelo de probabilidad estadística, es decir, que no se ajustan a la recta de regresión representada, son las variables que más influyen en el proceso.

**Figura 64:** Método de Daniel para la reacción de síntesis del éster butílico de (R,S) Ibuprofeno catalizada por la lipasa cruda de *Rh.miehei*.

Según el análisis estadístico (Tabla 46) y el método de Daniel (Figura 64) las variables que más influyen en la reacción de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno catalizada por la lipasa cruda de *Rh.miehei* son: el tiempo de reacción ($b_B = 6,64$), la cantidad de enzima ($b_E = 7,92$) y la relación entre ambas variables ($b_{BE} = 6,82$).

A la vista de estos resultados el rendimiento de la reacción de esterificación catalizada por la lipasa cruda de *Rh.miehei* (Lipozyme® 10000L) se puede expresar en función de las variables más influyentes, según la ecuación 31.

$$\text{Rendimiento (\%)} = 5,30 + 7,92 X_E + 6,64 X_B + 6,82 X_{EB} \quad [31]$$

El significado físico del efecto positivo en el rendimiento, del tiempo de reacción y de la cantidad de enzima son evidentes. Por lo que se refiere a las otras variables analizadas se pudo deducir que:

a).- La no influencia de la velocidad de agitación (X_E) y de la cantidad de disolvente (X_F) indica que la reacción no es controlada por la difusión interparticular ni por la difusión en el seno de la reacción.

b).- Por último, la baja influencia de la temperatura de reacción puede ser debida a que en el intervalo de temperatura considerado no se produzca una variación apreciable de la actividad de la lipasa cruda de *Rh.miehei*.

IV.6.1.b.- Lipasa inmovilizada de *R.miehei* (Lipozyme® IM20)

Un estudio paralelo realizado con la lipasa de *Rh.miehei* inmovilizada por adsorción, podría conducir a resultados similares o diferentes, en función del grado de influencia del soporte en la actividad enzimática. En este estudio se consideraron las mismas variables que en el caso anterior, pero también se analizó la posible influencia de trazas de agua en el medio, ya que varios autores han descrito su importancia en la actividad de esta enzima²⁸¹⁻²⁸⁴. Esta variable no se consideró para la lipasa cruda, ya que era una disolución acuosa y por tanto la adición de agua no tenía ningún efecto sobre el proceso.

Los valores máximo, mínimo y central para cada variable aparecen en la Tabla 49.

Tabla 49: Variables y valores considerados en el Diseño estadístico de Experimentos para la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* (IM20).

VARIABLES	(+)	P.C.	(-)
relación ácido:alcohol (X_A)	4:1	1:1	1:4
tiempo reacción (X_B)	30 h	24 h	18 h
temperatura (X_C)	57 °C	37 °C	17 °C
velocidad agitación (X_D)	700 rpm	500 rpm	300 rpm
enzima inmovilizada (X_E)	450 mg	300 mg	150 mg
disolvente (X_F)	15 ml	10 ml	5 ml
agua (X_G)	0,6 ml	0,3 ml	0 ml

En la Tabla 50 se recogen los valores máximos y mínimos de cada variable para cada experimento, así como el rendimiento de cada reacción, expresado en porcentaje de éster sintetizado.

Tabla 50: Diseño factorial: Matriz experimental para la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* (IM20)

Exp	X_A	X_B	X_C	X_D	X_E	X_F	X_G	Y(%)
1	-	-	-	-	-	-	-	5,71
2	+	-	-	-	-	+	+	0
3	-	+	-	-	+	-	+	50,08
4	+	+	-	-	+	+	-	11,41
5	-	-	+	-	+	+	+	9,68
6	+	-	+	-	+	-	-	37,65
7	-	+	+	-	-	-	+	0
8	+	+	+	-	-	+	-	30,03
9	+	-	-	+	+	+	-	21,12
10	-	-	-	+	+	-	+	13,19
11	-	+	-	+	-	+	+	0
12	+	+	-	+	-	-	-	9,14
13	+	-	+	+	-	-	+	3,17
14	-	-	+	+	-	+	-	24,36
15	-	+	+	+	+	-	-	69,92
16	+	+	+	+	+	+	+	3,09
17	0	0	0	0	0	0	0	35,91
18	0	0	0	0	0	0	0	46,87
19	0	0	0	0	0	0	0	47,87

Con los datos obtenidos en cada reacción se realizó un análisis estadístico (Tabla 51)

y se aplicó el método de Daniel (Figura 65); con lo que se pudo determinar el grado de influencia de cada variable en la reacción de síntesis en medio orgánico catalizada por la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* (Lipozyme® IM20).

Tabla 51: Analisis estadístico obtenido del Diseño estadístico de Exeperimentos realizado para la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* (IM20)

Número de experimentos: 16

Grados de libertad: 15

Resultados del analisis estadístico:

$b_O = 18,03$	$b_{AB} = b_{CF} = b_{EG} = -10.57$
$b_A = -1.69$	$b_{AC} = b_{DG} = b_{BF} = -10.23$
$b_B = 7.35$	$b_{BC} = b_{DE} = b_{AF} = -0.30$
$b_C = 8.40$	$b_{AD} = b_{CG} = b_{EF} = -9.41$
$b_D = -0.07$	$b_{BD} = b_{CE} = b_{FG} = -2.27$
$b_E = 17.96$	$b_{CD} = b_{BE} = b_{AG} = 5.86$
$b_F = -1.48$	$b_{AE} = b_{BG} = b_{DF} = -0.34$
$b_G = -25.9$	

Análisis del punto central (t de Student)

nivel de confianza: 95 %

$C_m = 43,5 \%$

$t_2 (\alpha=0,05) = 2,9$

$S_x = 6,6$

límites de confianza: $\pm 13,7$

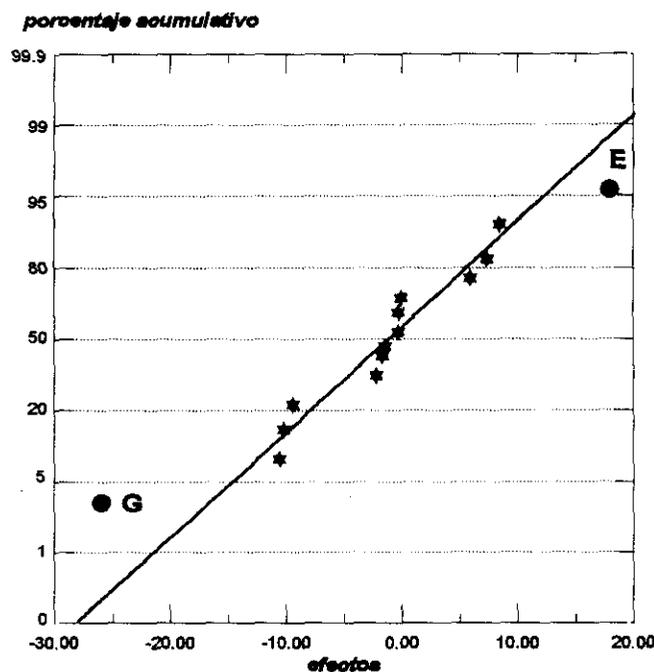


Figura 65: Método de Daniel para la reacción de síntesis del éster butílico de (R,S) Ibuprofeno catalizada por la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei*(IM20)

Una vez analizados los resultados obtenidos con el Diseño estadístico de Experimentos, se puede concluir que las variables más influyentes en la reacción de esterificación son: la cantidad de enzima ($b_E = 17,96$), y el agua añadida ($b_G = -25,93$). Además, se observa un ligero efecto positivo del tiempo de reacción ($b_B = 7,35$) y de la temperatura ($b_C = 8,40$), pero no llegan a alcanzar un nivel de significancia mayor del 95 %.

Así pues, las condiciones más favorables para la reacción catalizada por la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* serían: una temperatura elevada, sin adición de agua al medio, una elevada concentración de enzima y, obviamente, un tiempo largo de reacción.

A la vista de estos resultados el rendimiento de la reacción de esterificación catalizada por la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* (Lipozyme® IM20) se puede expresar según la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = 18,03 + 17,96 X_E - 25,93 X_G \quad [32]$$

Tras el estudio de la influencia de las variables de operación que pudieran influir en la reacción de síntesis del éster butílico de (R,S) Ibuprofeno, aplicando la metodología del Diseño estadístico de Experimentos, se puede concluir que la cantidad de enzima y el tiempo de reacción son los factores que más influyen en la reacción catalizada por la lipasa cruda de *Rh.miehei*, mientras que la cantidad de enzima y el agua añadida al medio de reacción son los factores más influyentes en el proceso catalizado por la lipasa cruda de *Rh.miehei*.

Para analizar con más detalle las variables más influyentes en la actividad de la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada, de acuerdo con los resultados obtenidos en el Diseño de Experimentos se utilizó la metodología denominada OVAT ("One Variable At Time", influencia de cada variable por separado), por la cual se analiza una determinada variable dentro del intervalo de trabajo, mientras las demás variables permanecen constantes. Las variables analizadas fueron las siguientes:

- * cantidad de enzima
- * tiempo de reacción

- * temperatura
- * agua añadida al medio
- * relación molar de sustratos (ácido:alcohol)

En estos ensayos se analizó la influencia de la variable estudiada tanto en el rendimiento de la reacción, como en la enantioselectividad del proceso.

IV.6.1.a.- Influencia de la CANTIDAD DE ENZIMA

Como indicó el Diseño estadístico de experimentos, la cantidad de lipasa utilizada es un factor influyente en el rendimiento de la reacción de síntesis de ésteres. El estudio detallado de su influencia en la evolución de dicha reacción permitió determinar la carga enzimática equivalente del derivado inmovilizado (Lipozyme® IM20) en función de su actividad sintetasa en medio orgánico. Para ello, se llevó a cabo la síntesis del éster butílico de Ibuprofeno en ciclohexano a 37 °C, catalizada por diferentes concentraciones de enzima cruda de *Rh.miehei*. Las reacciones se pararon tras 48 h de reacción.

IV.6.1.a.1.- Lipasa cruda de *Rh.miehei*

En la Figura 66 se representa el rendimiento de la reacción, expresado en porcentaje de éster sintetizado, frente a la concentración de proteínas de la lipasa cruda de *Rh.miehei*.

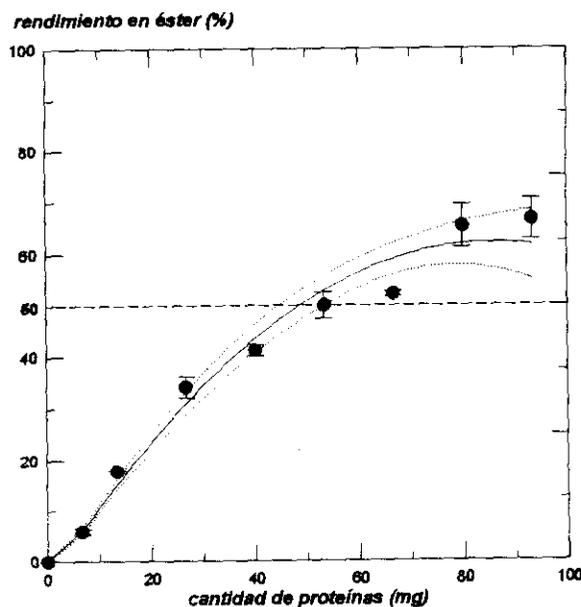


Figura 66: Influencia de la cantidad de proteína en la síntesis del éster butílico de Ibuprofeno catalizada por la lipasa cruda de *Rh.miehei* ($t_{\text{reacción}} \approx 48\text{h}$).

Los resultados obtenidos se ajustaron a la siguiente ecuación de segundo grado:

$$\hat{y} = - (3,7 \pm 0,7) x^2 + (1,54 \pm 0,09) x - (9 \pm 1) 10^{-3} \quad [33]$$

De la Figura 66 se deduce que, para cantidades de lipasa superiores a 80 mg de proteína ($V_T=10$ ml) se estabiliza el rendimiento de la reacción, debido a la enantioselectividad de la lipasa de *Rh.miehei*. La relación entre el rendimiento de la reacción y la cantidad de proteína es lineal hasta el 50% de rendimiento; a partir de ese punto, disminuye la concentración del enantiómero preferido (S) y la lipasa comienza a actuar sobre el otro enantiómero (R), pero debido a la menor afinidad de la lipasa por este último enantiómero la velocidad de reacción disminuye. La enantiopreferencia por el enantiómero S es la misma que la descrita en la reacción de hidrólisis del éster butílico de Ibuprofeno (ver Tabla 45), en la cual se hidroliza a mayor velocidad el éster S.

IV.6.1.a.2.- Lipasa inmovilizada de *R.miehei* (Lipozyme® IM20)

A continuación, se llevó a cabo la misma reacción de síntesis catalizada por distintas cantidades de derivado inmovilizado de *Rh.miehei* (Lipozyme® IM20). El rendimiento obtenido en dichas reacciones se interpoló en la curva de segundo grado (Figura 65), aplicando la correspondiente ecuación 33. En la Tabla 52 se recogen los rendimientos de dichas reacciones y el valor de actividad sintetasa residual del derivado inmovilizado (Lipozyme® IM20) (mg de proteína activa/mg de Lipozyme® IM20).

Tabla 52: Actividad retenida de la lipasa de *Rh.miehei* inmovilizada (Lipozyme® IM20) en la reacción de esterificación del Ibuprofeno con 1-butanol

cantidad de Lipozyme® IM20 (mg)	rendimiento (%)	activ.residual (mg prot activa/ mg derivado)
150	34±1	0,196
300	45±2	0,139
450	68±3	(*)

(*)No se pudo determinar la carga enzimática de la reacción catalizada por 450 mg de derivado inmovilizado porque el rendimiento obtenido estaba fuera del intervalo de actividad de la lipasa cruda.

El valor medio de la actividad retenida del derivado inmovilizado, expresado en función de la cantidad de proteína activa por cantidad de derivado fue $(0,17 \pm 0,04)$ mg de proteína activa/mg de Lipozyme® IM20. Este valor es semejante a la carga enzimática del mismo derivado determinada por Vazquez y cols.²⁷⁰, que fue de 0,12 mg de proteína/mg de Lipozyme® IM20, por lo que se puede concluir que toda la lipasa de *Rh.miehei* unida al soporte por adsorción mantiene su actividad sintetas inalterada. Además, se comprobó que la enzima inmovilizada de este derivado no se desorbía en medio orgánico (ciclohexano) (ver IV.1.1.b.; Tabla 16). Por el contrario, la actividad lipásica retenida en la reacción de hidrólisis de aceite de oliva, de este derivado (0,016 mg de proteína activa/mg de Lipozyme® IM20) se puede deber a la fracción enzimática desorbida al medio de reacción (ver IV.1.3.a.2.).

Tras este estudio se puede concluir que la lipasa de *Rh.miehei* inmovilizada (Lipozyme® IM20) es muy activa en la reacción de síntesis de ésteres en medio orgánico, pero pierde gran parte de su actividad cuando trabaja en medio acuoso, residiendo la actividad hidrolítica en la fracción protéica que se desorbe al medio.

IV.6.1.a.3.- Influencia en la enantioselectividad

Factor de enantioselectividad (FE)

Con el fin de determinar la enantioselectividad alcanzada en reacciones de segundo orden, en las que la velocidad de reacción depende de la concentración de dos sustratos, como ocurre en la reacción de síntesis de ésteres, se definió un nuevo parámetro de enantioselectividad que relaciona la velocidad de reacción de una determinada enzima sobre cada uno de los enantiómeros de una mezcla racémica.

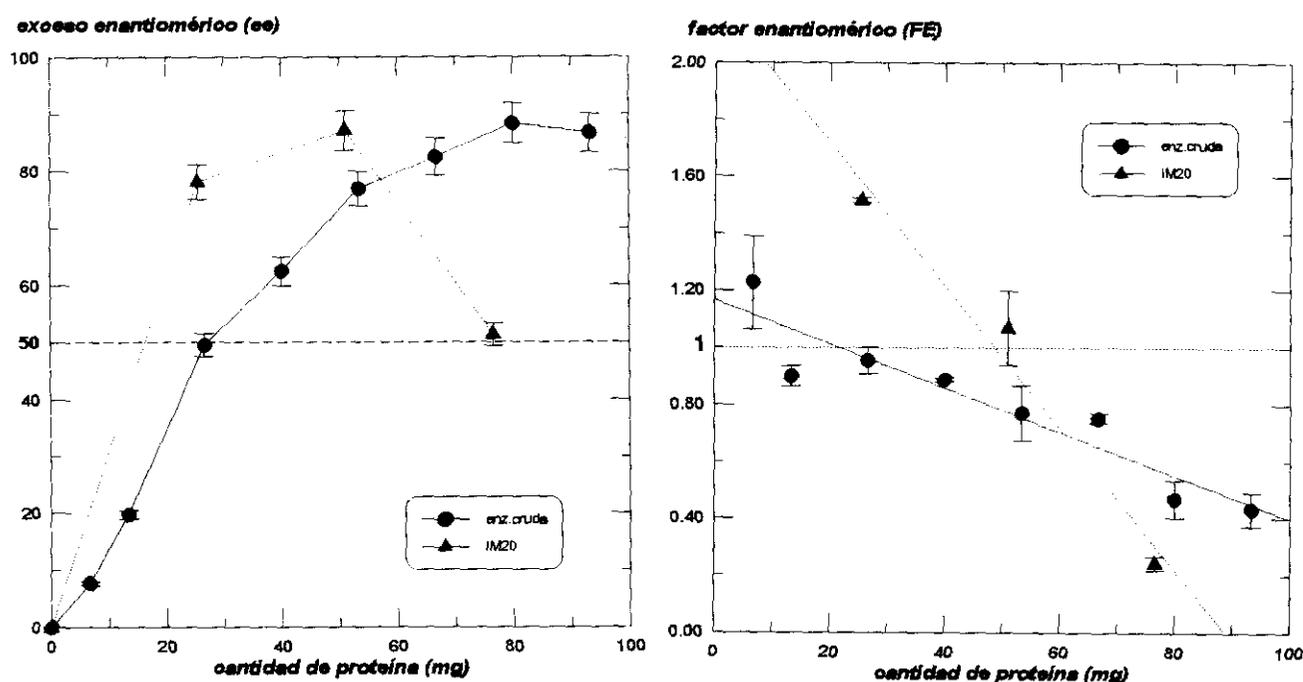
Este nuevo parámetro se denominó factor de enantioselectividad (FE), que se define como la relación entre el exceso enantiomérico medido experimentalmente tras un determinado tiempo de reacción y el exceso enantiomérico teórico que se obtendría si la enzima fuera enantioespecífica, considerando la conversión calculada para ese mismo tiempo de reacción.

$$ee_{teórico} = \frac{\text{rendimiento}}{100 - \text{rendimiento}} \quad [34]$$

$$y \quad FE = ee_{práctico} / ee_{teórico} \quad [35]$$

El máximo valor de FE es 1 y se alcanza cuando la conversión es superior al 50 %. En ese momento la enzima deja de ser enantioselectiva y comienza a utilizar el enantiómero no preferente, por lo que disminuye el valor de FE. Hasta el 50 % de conversión el valor de FE aumenta proporcionalmente con el tiempo de reacción, si la enzima es enantioselectiva.

A continuación, se representa el exceso enantiomérico de ácido remanente (ee) (Figura 67A) y el factor de enantioselectividad (FE) (Figura 67B) alcanzados en la reacción de esterificación enantioselectiva del (R,S) Ibuprofeno frente a la cantidad de proteína. La cantidad de proteínas del derivado inmovilizado se estableció utilizando el valor de carga enzimática en función de la actividad sintetasa ($0,17 \pm 0,04$) mg proteína activa / mg de Lipozyme® IM20.



Figuras 67: Representación de la enantioselectividad ((A) ee y (B) FE) en la síntesis del éster butílico de (R,S) Ibuprofeno a 48 h, catalizada con cantidades variables de lipasa cruda e inmovilizada de *Rh.miehei*

Como se observa en la Figura 67A, con ambas lipasas existe una relación inversa entre la cantidad de proteínas del biocatalizador y la enantioselectividad, expresada en función de FE, parámetro que relaciona el exceso enantiomérico (ee) y el rendimiento en éster de la reacción.

Asimismo, puede observarse (Figura 67B) que la enantioselectividad de la lipasa cruda de *Rh.miehei* es más uniforme debido a su menor actividad. El valor de FE de las reacciones catalizadas por esta enzima se estabiliza en 0,8 para un intervalo de proteínas amplio (entre 10 y 70 mg). Por el contrario, en las reacciones catalizadas por la lipasa inmovilizada se produce una brusca variación de FE, al variar la cantidad de proteína debido a su mayor actividad. La drástica disminución de FE es debida a que el rendimiento alcanzado es superior al 50 % (68%), lo que indica que la enzima ha dejado de actuar selectivamente sobre el enantiómero S.

Comparando ambos biocatalizadores, desde el punto de vista industrial, el derivado inmovilizado (Lipozyme IM20) es el más ventajoso en esta reacción de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno, ya que se obtiene la máxima enantioselectividad y rendimiento en éster, con la menor cantidad de derivado, como se deduce de la Figura 67A.

IV.6.1.b.- Influencia del TIEMPO DE REACCION

El tiempo de reacción es una de las variables de operación que más influyen en la reacción de síntesis de ésteres, según se desprende del estudio del Diseño de Experimentos.

Como era de esperar, al aumentar el tiempo de reacción aumenta también el rendimiento. Con el fin de comparar la actividad de las dos lipasas comerciales de *Rh.miehei* (cruda (Lipozyme® 10000L) e inmovilizada (Lipozyme® IM20)) se llevó a cabo un estudio de la evolución de la reacción estándar de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno a lo largo del tiempo.

El rendimiento de la reacción se expresó en mmoles sintetizados por mg de proteína, debido a que la concentración de proteínas de ambas lipasas es diferente:

* enzima cruda (Lipozyme® 10000L) → (64±2) mg proteína/ml

* enzima inmovilizada (Lipozyme® IM20) → 0,12 mg proteína/mg²⁷⁰

En la Figura 68 se representa el rendimiento de cada reacción frente al tiempo.

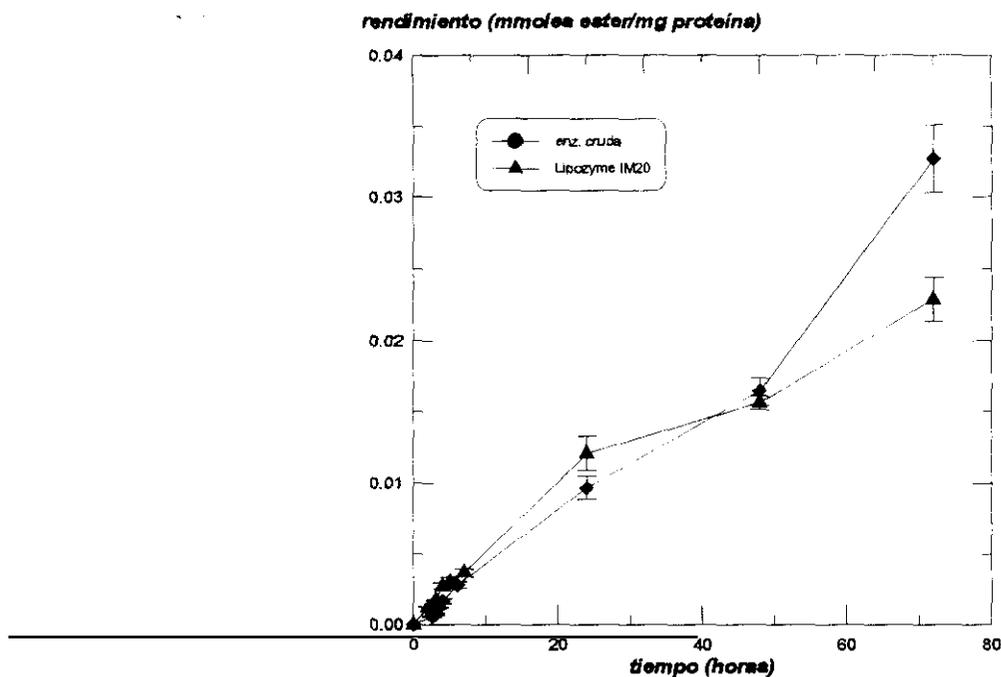


Figura 68: Evolución de la reacción de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno, catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* cruda (Lipozyme® 10000L) e inmovilizada (Lipozyme® IM20).

La curva obtenida para cada enzima se ajustó a una cinética de primer orden ($\text{rendimiento} = A(1 - e^{-kt})$) y se determinó el valor de la velocidad inicial de cada reacción ($V_0 = A k$).

Para analizar la enantioselectividad de las dos enzimas se determinó el valor de exceso enantiomérico (ee) y factor de enantioselectividad (FE) tras 72 h de reacción, valores que, junto con el rendimiento obtenido a ese tiempo y la V_0 de cada reacción se recogen en la Tabla 53.

Tabla 53: Resultados de rendimiento, enantioselectividad (ee) y (FE) y velocidad inicial (V_0) de la reacción de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno, catalizada por la lipasa cruda (Lipozyme® 10000L) e inmovilizada (Lipozyme® IM20) de *Rh.miehei*.

ENZIMA	t (h)	rend. (%)	ee (%)	FE	V_0 (mmol/h mg prot)
CRUDA	48 h	33±2	49±2	1,0	0,4 10 ⁻³
	72 h	68±5	68±3	0,3	
IM 20	48 h	45±2	78±4	0,98	0,7 10 ⁻³
	72 h	66±4	85±4	0,4	

La velocidad inicial de la reacción estándar de síntesis de ésteres catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada fue muy similar. Al analizar el rendimiento de cada reacción expresado en porcentaje de éster sintetizado, sin considerar la concentración de proteínas de cada biocatalizador, se observa que el rendimiento alcanzado tras 48 h de reacción, es menor para la lipasa cruda, debido probablemente a su menor enantioselectividad, como ya se observó en la sección anterior, lo que hace que la reacción se desarrolle más lentamente hasta alcanzar el 50% de conversión, punto en el cual ambas enzimas actúan sobre el enantiómero R no preferente, disminuyendo la velocidad de reacción y alcanzando en ambos casos el mismo rendimiento (72h). Este proceso se expresa por el valor del factor de enantioselectividad (FE), que a 48h de reacción es prácticamente uno, lo que indica que ambas enzimas son totalmente enantioespecíficas. A 72 h de reacción se ha superado el 50% de conversión, las enzimas actúan sobre el enantiómero no preferentemente y disminuye drásticamente el valor de FE hasta 0,4 y 0,3 respectivamente.

Tras este estudio comparativo de la actividad de las dos preparaciones comerciales de la lipasa de *Rh.miehei* (cruda (Lipozyme® 10000L) e inmovilizada (Lipozyme® IM20)) se llegó a la conclusión de que ambas enzimas presentan la misma actividad y enantioselectividad en la reacción estándar de síntesis de ésteres, catalizada por 300 mg de Lipozyme® IM20 y 0,4 ml de Lipozyme® 10000L. Asimismo, se observa que la influencia del tiempo de reacción en la conversión es lineal en todo el intervalo, lo que explica el elevado nivel de significancia obtenido en el Diseño estadístico de Experimentos.

IV.6.1.c.- Influencia de la TEMPERATURA

La temperatura es una de las variables que más influyen en la actividad de la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* (Lipozyme® IM20), según se comprobó en el Diseño de Experimentos (ver IV.6.1.). Por esta razón se estudió con detenimiento su influencia en la reacción de síntesis del éster butílico de (R,S) Ibuprofeno en ciclohexano, catalizada por la lipasa inmovilizada y cruda de *Rh.miehei*, lo cual permitió, además comparar la influencia de la temperatura en la actividad y enantioselectividad de ambas enzimas.

El intervalo de temperaturas considerado fue entre 4 y 100 °C; más amplio que el analizado por Svanholm²⁸⁵ y Eigtved²⁷⁸ (25-80 °C) para ambas lipasas de *Rh.miehei*. De esta forma se estudió la influencia de temperaturas extremas.

En las Figuras 69 y 70 se representan los resultados obtenidos en la reacción de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno, tras 24 horas de reacción, a diferentes temperaturas.

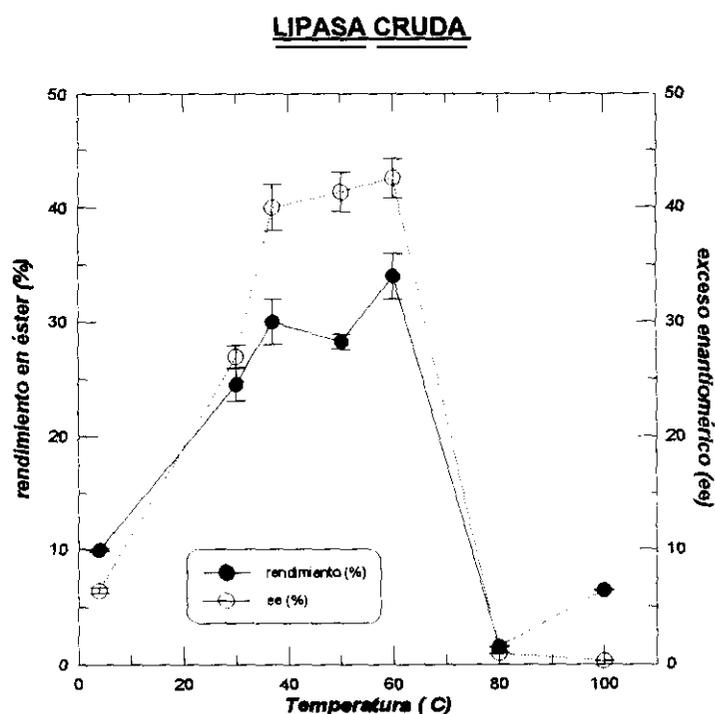


Figura 69: Rendimiento (%) y enantioselectividad (ee) de la reacción de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno catalizada por la lipasa cruda de *Rh.miehei* a diferentes temperaturas (tiempo reacción 24h).

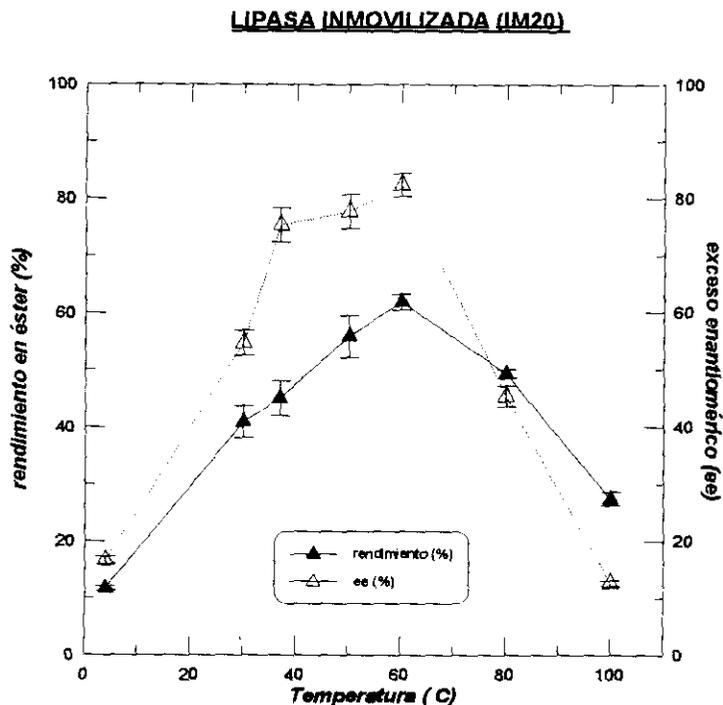


Figura 70: Rendimiento (%) y enantioselectividad (ee) de la reacción de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno catalizada por la lipasa inmovilizada (IM20) de *Rh.miehei* a diferentes temperaturas (tiempo reacción 24h).

Una de las principales ventajas de la inmovilización enzimática es el aumento de la termoestabilidad de los derivados respecto de la lipasa cruda. Este hecho se observa en las Figuras 69 Y 70, ya que la temperatura de máxima actividad de la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* (Lipozyme® IM20) fue de 70°C; mientras que el intervalo térmico de mayor actividad para dicha lipasa cruda fue entre 37 y 60 °C.

La productividad de una lipasa depende de su actividad y su velocidad de desactivación, así como del tipo de reacción. Dado que la velocidad de desactivación aumenta con la temperatura como consecuencia de la desnaturalización protéica, a partir de esta temperatura (60-70°C) se produce una brusca disminución de la actividad enzimática, llegando a ser prácticamente nula a 80 y 100 °C.

La documentación facilitada por el laboratorio Novo-Nordisk, suministrador de la lipasa cruda e inmovilizada de *Rh.miehei*, indica que en la reacción test de hidrólisis de tributirina la temperatura óptima de trabajo para la lipasa cruda es de 35-50°C y para la

misma lipasa inmovilizada es de 70 °C²⁵¹. Estos resultados coinciden también con los resultados obtenidos por Eigtved²⁷⁷ en la reacción de síntesis de ceras y Svanholm²⁸⁵ en la reacción de interesterificación del aceite de coco con estearina de palma, los cuales observaron que en ambas reacciones la temperatura de máxima actividad de la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* (Lipozyme® IM20) fue 70 °C.

Asimismo, Gandhi y cols.²⁸⁶ llevaron a cabo la reacción de síntesis del laurato de laurilo catalizada por la lipasa cruda de *Rh.miehei* (Lipozyme® 10000L), obteniendo la máxima actividad sintética en el intervalo de 40-50 °C, mientras que a 29 °C la actividad era menor y a 60 °C, aunque el rendimiento de la reacción es máximo durante las primeras horas de reacción, éste se estabiliza y resulta ser muy inferior al rendimiento final obtenido a menor temperatura.

Aunque la máxima actividad enzimática de la lipasa inmovilizada se alcanzó a 60 °C y puesto que el intervalo de máxima actividad de la lipasa cruda se encuentra entre 37 y 60 °C la reacción estándar utilizada en la presente Tesis Doctoral se llevó a cabo a 37 °C, con el fin de evitar la evaporación del disolvente orgánico y minimizar los procesos de desnaturalización proteica, como indicaron Manjón y cols.²⁸⁷

IV.6.1.c.1.- Influencia de la temperatura en la enantioselectividad

En las Figuras 69 Y 70 se observó que tanto la lipasa cruda como la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* alcanzan los valores máximos de exceso enantiomérico (ee) en el intervalo de temperaturas 37-60°C, produciéndose una brusca disminución de la enantioselectividad del proceso a temperaturas superiores.

Con el fin de estudiar con mayor profundidad la influencia de la temperatura en la enantioselectividad de la lipasa de *Rh.miehei* se representó la variación del factor de enantioselectividad (FE) frente a la temperatura (Figura 71).

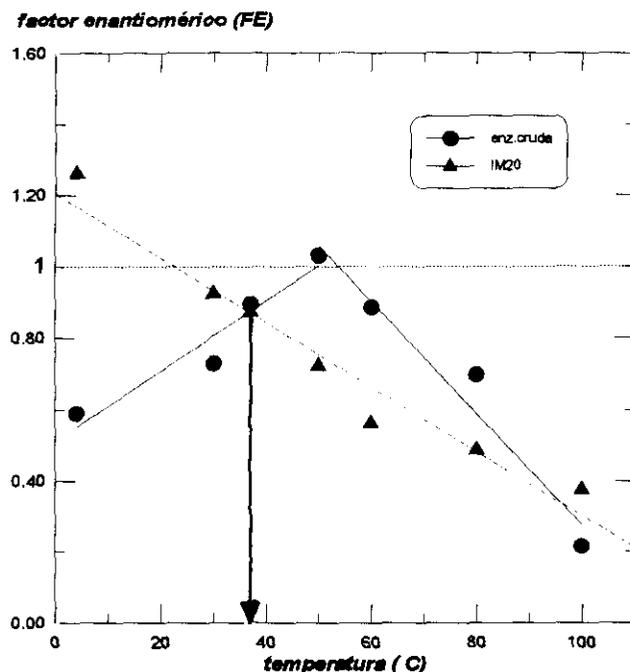


Figura 71: Variación del factor de enantioselectividad con la temperatura, para la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada (IM20).

En la Tabla 54 se recogen los valores de exceso enantiomérico (ee), factor de enantioselectividad (FE) y rendimiento alcanzado en las reacciones realizadas en un intervalo de temperaturas entre (4 y 100 °C).

Tabla 54: Grado de enantioselectividad o (ee y FE) y rendimiento (%) de la reacción de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno (24h), catalizada por la lipasa cruda e inmovilizada de *Rh.miehei*.

Temp. (°C)	enzima cruda			enzima inmovili		
	rend. (%)	ee ^(*) (%)	FE	rend. (%)	ee ^(*) (%)	FE
4	9,9±0,1	6,4±0,2	0,6	11,6±0,	16,1±0,6	1,2
30	24±1	26±1	0,8	41±2	55±2	0,8
37	30±2	40±2	0,9	45±3	75±3	0,9
50	28±1	41±1	1,0	56±4	78±3	0,6
60	34±3	42±2	0,8	62±1	82±3	0,5
80	1,5±0,1	0,90±0,03	0,6	49±1	45±2	0,4
100	6,4±0,1	0,30±0,01	0,05	27±1	12,1±0,5	0,3

(*) ee del ácido remanente

En la Figura 71 se observa una correlación inversa entre el factor de enantioselectividad y la temperatura para la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei*, mientras que la lipasa cruda se produce un aumento lineal de este factor con la temperatura hasta alcanzar un máximo valor máximo a 50 °C, disminuyendo drásticamente a partir de esa temperatura.

Esta correlación inversa entre la temperatura y la enantioselectividad, expresada a través del coeficiente enantiomérico (E), definido para reacciones de primer orden (ver II.2.5.b.1.), se ha observado en otras lipasas como la de *C.cylindracea*²⁸⁸, la de *P.cepacea*²⁸⁹ y la lipasa pancreática porcina²⁹⁰, coincide con las previsiones postuladas por Otto²⁹¹. Según este autor, la disminución de la enantioselectividad es consecuencia de la deformación que sufre la cavidad donde se sitúa el centro activo de las lipasas al aumentar la temperatura del medio.

Asimismo se observa que a 37 °C se obtuvo el mismo valor de FE para ambas enzimas, por lo que la reacción estándar de síntesis de ésteres butílicos de ácidos (R,S) 2-arilpropiónicos se llevó a cabo a esa temperatura.

IV.6.1.d.- Influencia de la CANTIDAD DE AGUA EN EL MEDIO

Como ya se indicó en la Introducción de la presente Memoria (ver II.2.6.c.) el agua desempeña un papel fundamental en las reacciones enzimáticas que se desarrollan en medio orgánico. En la reacción de síntesis enantioselectiva del éster butílico de (R,S) Ibuprofeno, catalizada por la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* (Lipozyme® IM20), la concentración de agua en el medio de reacción es la variable que más influye en la actividad de dicha enzima según se dedujo en el estudio de las variables de operación tras aplicar la metodología del Diseño estadístico de Experimentos. Según este estudio, la presencia de agua en el medio es muy perjudicial para la actividad sintetasas de esta lipasa ($b_G = -25,9$; ver Tabla 51). No obstante, como indicaron Zaks y Klibanov¹³, la cuestión principal consiste en determinar la mínima cantidad de agua necesaria para que una determinada enzima mantenga su conformación nativa y, por tanto, su actividad. Por ello hay que analizar y considerar la hidrofilia del soporte y del medio de reacción.

El soporte del derivado Lipozyme® IM20 es una resina de intercambio aniónico, que fue específicamente seleccionada con el fin de que fuera capaz de retener el agua esencial para la lipasa de *Rh.miehei*⁹⁸. El contenido en agua de Lipozyme® IM20 es de aproximadamente un 10% (p/p), concentración óptima para el desarrollo de la actividad de este derivado en medio orgánico²⁵¹.

La cantidad de agua que contiene el derivado IM20 se cuantificó siguiendo dos metodologías:

* la técnica de Karl-Fischer²⁹²

* el método descrito por Rizzi y cols.²⁹³, que se basa en el secado del derivado inmovilizado, durante 48 h, en un desecador a vacío que contiene P₂O₅ en polvo (ver III.9.2.). La medida de la cantidad de agua perdida se hizo por diferencia de pesada, antes y después de calentar el derivado desecado durante 3h a 105 °C en un horno.

Tabla 55: Contenido en agua del derivado inmovilizado (IM20) de la lipasa de *Rh.miehei*

METODO	contenido en agua (%)
Karl-Fischer	9,8 %
secado a vacío con P ₂ O ₅	8,6 %

El resultado obtenido por ambas metodologías fue similar, alrededor de un 10 % (p/p), como se describe en la bibliografía²⁵¹.

IV.6.1.d.1.- Isotermas de adsorción

Con el fin de establecer la cantidad de agua esencial para el desarrollo de la actividad de la lipasa de *Rh.miehei* se utilizó un método sencillo que permitiera establecer las condiciones óptimas de hidratación, en términos de actividad de agua (a_w), que requiere esta enzima para desarrollar al máximo su actividad. Para ello se realizó la isoterma de adsorción de la lipasa de *Rh.miehei* inmovilizada (Lipozyme® IM20) tanto en aire, como en ciclohexano, disolvente orgánico utilizado en la reacción estándar de síntesis de ésteres.

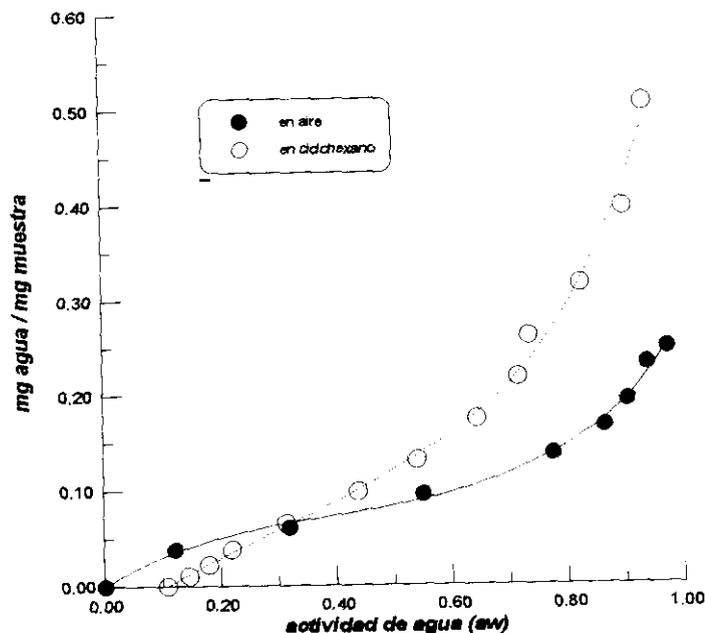


Figura 72: Isotermas de adsorción de la lipasa inmovilizada de *Rh. miehei* (IM20) con y sin 1 ml de ciclohexano anhidro.

Puede observarse en la Figura 72 como las isotermas de la lipasa inmovilizada (IM20) realizadas en aire y en ciclohexano se cruzan en $a_w = 0,3$, lo que implica un cambio de tendencia del sistema para valores de a_w por encima y por debajo de ese valor.

Para bajos niveles de hidratación ($a_w < 0,3$), tanto el ciclohexano seco como el derivado IM20 adsorben agua, por lo que la isoterma en ciclohexano va por debajo de la isoterma en aire. Por el contrario, para valores de $a_w > 0,3$, el ciclohexano se encuentra saturado de agua, y rechaza las nuevas moléculas que se van añadiendo. Debido a este comportamiento del disolvente, para una determinada cantidad de agua añadida se alcanza un valor de a_w muy superior en el sistema en aire¹²⁰.

Según lo observado por Valivety y cols.¹²⁰ la isoterma del derivado inmovilizado Lipozyme® IM20 es similar a la isoterma de la resina de intercambio aniónico, soporte de este derivado inmovilizado. Por tanto, en este la mayoría de las moléculas de agua se adsorben sobre la superficie libre del soporte, siendo posteriormente distribuidas a las moléculas de proteína adsorbidas en su superficie.

Para comprobar el grado de influencia del soporte en la adsorción de moléculas de agua se realizó la isoterma de la lipasa cruda de *Rh.miehei* (Lipozyme® 10000L) en aire y en ciclohexano anhidro. Esta lipasa es una disolución acuosa y presenta un elevado contenido en azúcares, por lo que fue extremadamente complejo liofilizarla, ya que no se pudo congelar por procedimientos convencionales. Aunque finalmente se logró desecar congelándola a -180 °C con nitrógeno líquido (ver III.9.2.).

En la bibliografía se recogen algunas isotermas del derivado inmovilizado de *Rh.miehei* (Lipozyme® IM20)^{109,121,295} pero no se ha encontrado ninguna información acerca de la lipasa cruda de *Rh.miehei*, debido probablemente a las dificultades experimentales antes mencionadas.

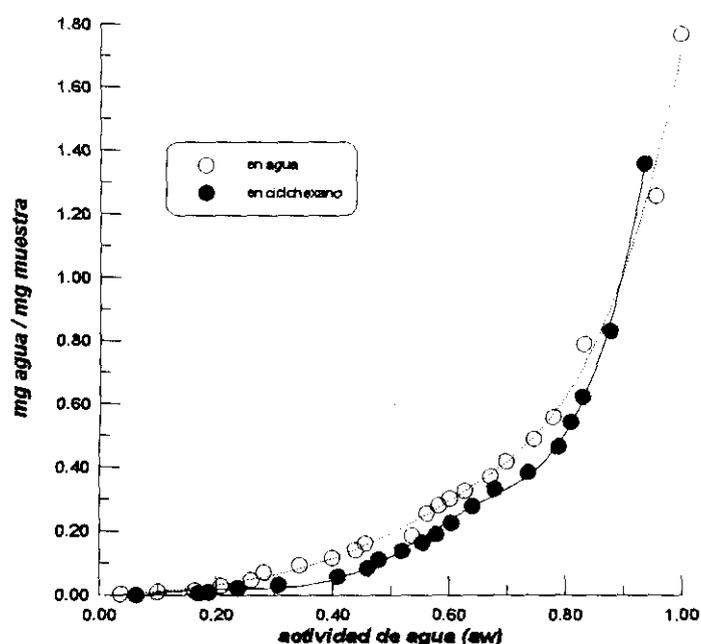


Figura 73: Isotermas de adsorción de la lipasa cruda de *Rh.miehei* con y sin 1 ml de ciclohexano anhidro:

Las isotermas de la lipasa cruda de *Rh.miehei* en aire y en ciclohexano son muy similares, lo que indica que en este caso las moléculas de agua no son captadas por el disolvente orgánico sino por las proteínas. En las primeras fases de la isoterma al añadir

pequeñas cantidades de agua se producen importantes variaciones en el valor de a_w , lo que indica que la enzima cruda, forzada a llegar a un extremo de deshidratación muy acusado tiende a rehidratarse con avidez, fenómeno que en parte es dificultado por la presencia del disolvente, pues éste rechaza las moléculas de agua y provoca que la rehidratación de la enzima sea más difícil. No obstante, este fenómeno es mucho más acusado que en el caso del derivado inmovilizado ya que para alcanzar un valor de a_w superior a 0,4 es necesario añadir mayor cantidad de agua a la lipasa cruda, como se observa en la Figura 74, en la que se superponen las isotermas de ambas enzimas.

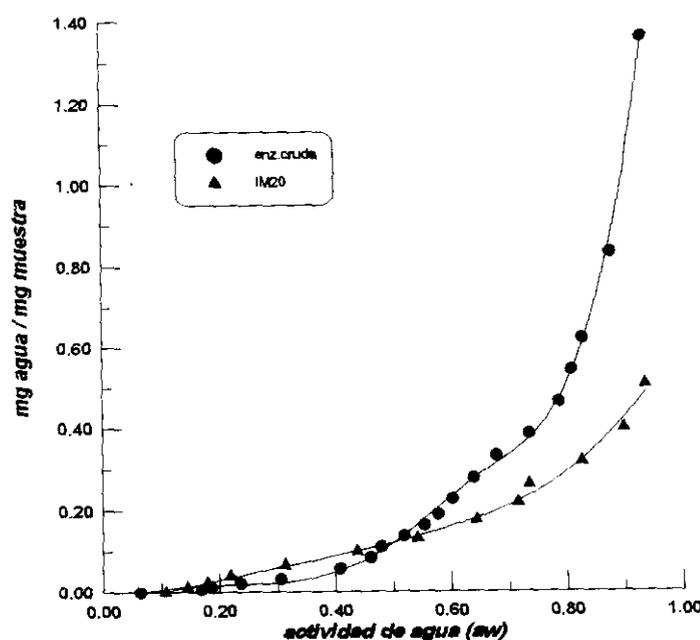


Figura 74: Isotermas de la lipasa de *Rh. miehei* cruda e inmovilizada, con 1 ml de ciclohexano anhidro.

Como se observa en la Figura 74 la primera parte de ambas isotermas es semejante, pero a partir de aproximadamente $a_w = 0,4$ las isotermas se separan. Este hecho indica que en la primera fase de la isoterma, correspondiente al agua fuertemente ligada a la enzima el agua se adsorbe preferentemente sobre la proteína, pero a partir de una actividad de agua superior a 0,4 las moléculas son aceptadas por el soporte, por lo que la isoterma del derivado inmovilizado crece más lentamente.

IV.6.1.d.2.- Influencia de la a_w en la actividad de la lipasa de *Rh.miehei*.

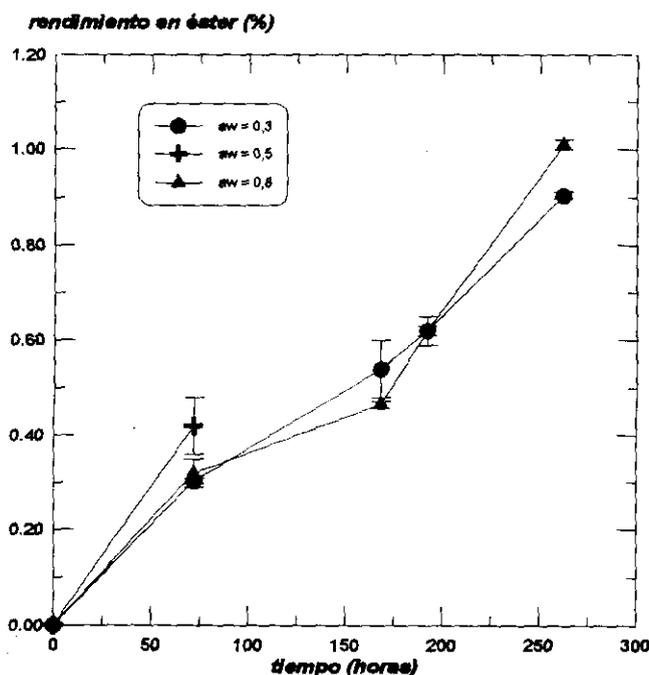
Para analizar la influencia de la actividad de agua del biocatalizador en el desarrollo de la reacción de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno en ciclohexano se siguieron dos metodologías:

- a).- pre-equilibrando la lipasa a un determinado valor de a_w
- b).- sin pre-equilibrar la lipasa a un determinado valor de a_w

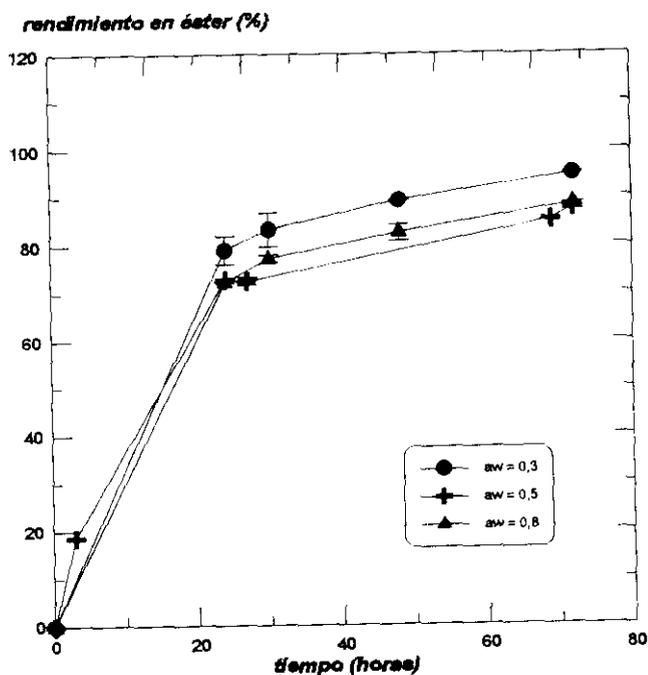
A).- Pre-equilibrio de la lipasa de *Rh.miehei* a un determinado valor de a_w

A continuación, se realizaron una serie de reacciones, ajustando y equilibrando previamente ambas lipasas a determinados valores de actividad de agua (0,3; 0,5 y 0,8).

En las Figuras 75 y 76 se representan los rendimientos de la reacción estándar de síntesis de la lipasa cruda e inmovilizada de *Rh.miehei* para determinados valores de a_w .



Figuras 75: Rendimiento de las reacciones de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno catalizadas por la lipasa cruda de *Rh.miehei* pre-equilibrada a valores de a_w de 0,3; 0,5 y 0,75



Figuras 76: Rendimiento de las reacciones de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno catalizadas por la lipasa inmovilizada (IM20) de *Rh.miehei* pre-equilibrada a valores de a_w de 0,3; 0,5 y 0,75.

En la Tabla 56 se recogen los valores de rendimiento y exceso enantiomérico de las reacciones de síntesis ajustadas a un determinado valor de a_w .

Tabla 56: Rendimiento y exceso enantiomérico de la reacción de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada, ajustadas a valores de a_w de 0,3; 0,5 y 0,8 respectivamente (tiempo reacción= 72 h).

	enzima cruda		enzima inmoviliza	
	rend (%)	ee (%)	rend (%)	ee (%)
$a_w = 0,3$	$0,303 \pm 0,005$	$0,39 \pm 0,01$	95 ± 1	71 ± 3
$a_w = 0,5$	$0,42 \pm 0,06$	$0,24 \pm 0,01$	87 ± 1	79 ± 3
$a_w = 0,75$	$0,32 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,007$	88 ± 1	69 ± 2

En la Tabla 56 se observan notables diferencias en la actividad de la lipasa cruda e inmovilizada de *Rh.miehei*. El rendimiento de la reacción catalizada por la lipasa cruda deshidratada es prácticamente nulo tras 72 h de reacción, por lo que se dejaron transcurrir

estas reacciones durante 262 h, aunque el rendimiento alcanzado fue de aproximadamente el 1 % para todas las actividades de agua analizadas, como se observa en la Figura 75. Esta pérdida de actividad debe ser consecuencia de las condiciones tan drásticas de desecación a que fue sometida la lipasa cruda, que provocarían importantes alteraciones en la conformación de la lipasa, que no se recuperaron a pesar de la rehidratación de la enzima. Esta lipasa, aunque muestra una tendencia ascendente en cuanto a su actividad a tiempos muy largos de reacción, solamente llega al 1% de rendimiento.

Por el contrario, la lipasa inmovilizada incrementa su actividad de forma espectacular tras equilibrarla hasta valores fijos de a_w (Figura 76). Aunque las diferencias en cuanto al rendimiento de las reacciones, a diferentes valores de actividad de agua, son insignificantes, como se observa en la Figura anterior, al analizar los resultados recogidos en la Tabla 55 a un tiempo fijo de 72 h se observa que al aumentar el contenido en agua ($a_w = 0,5$ y $0,8$) se produce una ligera disminución de la actividad enzimática, como ya fue descrito por Monot²⁹⁶ debido a que para elevados valores de a_w la preparación enzimática está tan hidratada que se obstaculiza la libre difusión de los sustratos hidrofóbicos hasta el centro activo de la enzima, disminuyendo la velocidad de la reacción. Asimismo Klibanov y Zaks⁸² observaron que cuando se alcanza el límite de la solubilidad de una determinada enzima en agua las moéculas de enzima tienden a formar aglomerados desprovistos de actividad catalítica. Efectos similares fueron descritos por Vazquez y cols.²⁷⁰.

B).- Sin pre-equilibrio de la lipasa de *Rh.miehei* a un determinado valor de a_w

Para estudiar el comportamiento del sistema con diferentes valores de agua se procedió a realizar una serie de experimentos consistentes en cuantificar el rendimiento de diferentes reacciones de esterificación de Ibuprofeno con butanol en ciclohexano (ambos previamente desecados (ver III.1.2.), utilizando como biocatalizador diferentes preparaciones del derivado inmovilizado IM20, desecado y con un exceso de agua, con el fin de compararlos con el comportamiento del sistema habitual, esto es, el derivado IM20 utilizado sin manipulaciones previas.

Para poder establecer un parámetro relativo que defina la cantidad de agua que lleva el derivado IM20, se utilizó el valor de a_w , bien sea medido directamente, o bien a través de

la isoterma correspondiente, a partir de la lectura del valor de a_w según el contenido en agua del sistema.

Así en la siguiente gráfica (Figura 77) se muestran las conversiones obtenidas con 3 sistemas diferentes:

- a).- catalizador IM20 convencional ($a_w=0,382$)
- b).- catalizador IM20 desecado ($a_w= 0,138$)
- c).- catalizador IM20 + 300 mg de agua ($a_w \geq 1$)

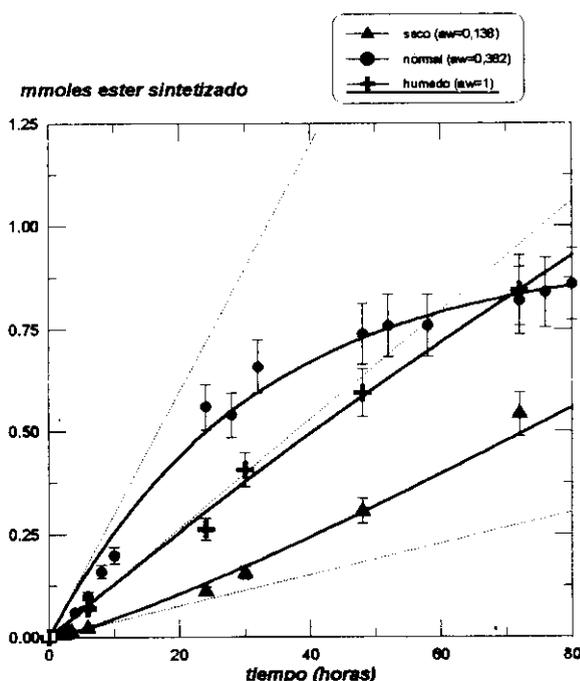


Figura 77: Rendimiento obtenido en la reacción de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno, catalizada por el derivado inmovilizado IM20 convencional, desecado y con exceso de agua.

Como puede observarse, el resultado obtenido es sensiblemente diferente. Así, para el valor más bajo de a_w , se observa una menor conversión, así como un cierto comportamiento sigmoide, con un período de inflexión o latencia, mientras que para el sistema estándar ($a_w=0,382$) se observa el característico comportamiento de cinética de pseudoprimer orden. Por su parte, para el derivado hidratado ($a_w \geq 1$), el rendimiento obtenido se sitúa en una zona intermedia entre los otros dos casos. A la vista de estos resultados se puede concluir que, cuando el sistema biocatalítico se lleva a bajos valores de a_w , a medida que progresa la

reacción, esto es, se va formando el éster butílico del Ibuprofeno, al mismo tiempo se va generando agua. Puesto que en esta zona de la isoterma la curva del sistema en aire queda por encima de la del ciclohexano se puede considerar que el agua que se va generando es atrapada por el ciclohexano, y por tanto, no puede rehidratar correctamente a la enzima, por lo que el rendimiento obtenido no es excesivamente bueno.

Para el caso del catalizador en su estado estándar ($a_w = 0,382$), la situación del derivado está muy próxima al punto de corte de ambas isotermas del derivado IM20 en aire y en ciclohexano. Este hecho implica que el agua que lleva el catalizador "per se" (10% (p/p))²⁵¹ puede ser compartida entre el catalizador y el disolvente, de forma que se puede considerar que esta es la zona óptima de trabajo del derivado Lipozyme® IM20.

Para elevados valores de a_w , el agua en exceso, que debería inhibir la reacción de síntesis de ésteres por la ley de acción de masas, es rechazada por el ciclohexano, que no la disuelve, impidiendo que llegue hasta el biocatalizador, modulando así el efecto inhibitorio esperado y, por tanto, permitiendo el desarrollo de la síntesis de ésteres. Vazquez y cols.²⁷⁰ indican que se produce una drástica reducción de la velocidad inicial de la reacción de síntesis del laurato de geranilo, catalizada por Lipozyme® IM20 al saturar este derivado enzimático con agua utilizando isooctano saturado en agua como disolvente. El hecho de que el disolvente esté saturado en agua provoca este efecto inhibitorio, ya que la enzima desecada capta con avidez el agua del disolvente, siendo activa desde el primer momento y provocando su rápida inhibición. Las moléculas de agua en exceso se colocan alrededor del derivado inmovilizado formando una serie de capas: según va aumentando el grosor de estas capas se dificulta el acceso del sustrato hasta la enzima, debido a la baja solubilidad de estos sustratos en agua, por lo que se produce una disminución en la velocidad de la reacción estudiada por Vazquez y cols.²⁷⁰. En nuestro caso, dado que la enzima y el disolvente han sido desecados previamente, ambos compiten por las moléculas de agua, por lo que se produce un período de latencia en la actividad que coincide con la rehidratación lenta inicial del derivado.

En la Figura 78 se muestran dos microfotografías en las que se puede comparar el estado del derivado inmovilizado Lipozyme® IM20 antes y después de la reacción de esterificación, desarrollada en isooctano saturado en agua²⁷⁰.



Figura 78: Microfotografías en las que se muestra el estado del derivado inmovilizado IM20, a tiempo cero (A) y tras la tercera reutilización (B). Las flechas señalan las moléculas de agua²⁷⁰.

En la Figura 78B se observan las moléculas de agua dispuestas alrededor del derivado inmovilizado. Estas imágenes confirman el efecto físico del agua al acumularse sobre el derivado IM20.

En conclusión, para ambas metodologías, sin y con previa equilibración del derivado de la lipasa de *Rh. miehei* inmovilizado por adsorción sobre una resina de intercambio aniónico (Lipozyme® IM20), se obtienen mejores resultados para valores de $a_w \approx 0,3-0,4$ (punto de corte de las dos isoterms de este derivado en aire y en ciclohexano (Figura 72).

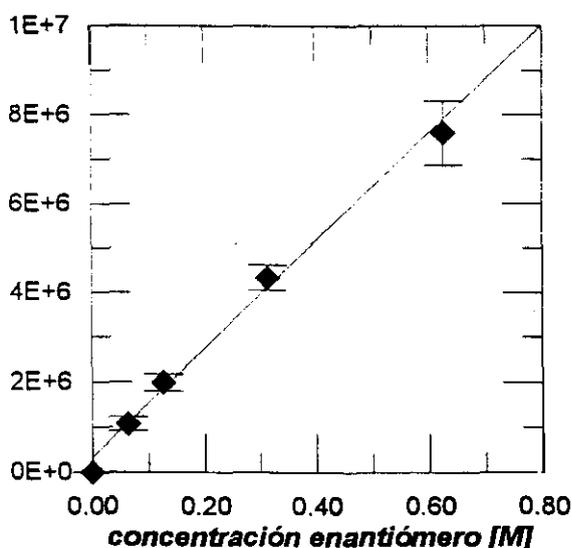
Asimismo, si el derivado inmovilizado IM20 se pre-equilibra a un determinado valor de a_w , se obtienen mejores conversiones globales que si el catalizador no se pre-equilibra. Esto indica que en el segundo caso el pre-equilibrio del derivado se produce en el transcurso de la reacción de esterificación, por lo que la velocidad inicial de esta reacción es menor, debido a la existencia de un período inicial de latencia.

IV.6.1.e.- Influencia de la RELACION MOLAR DE SUSTRATOS (ácido/alcohol)

Para estudiar la influencia de la concentración de los sustratos de la reacción de síntesis de ésteres, catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada (IM20) se realizaron una serie de reacciones en las que se varió la concentración de uno de los dos sustratos de la reacción estándar de síntesis (ácido= (R,S) Ibuprofeno y alcohol= butanol), manteniendo constantes las otras condiciones de reacción.

Sin embargo, la cuantificación de las reacciones se llevó a cabo de forma distinta, monitorizando la disminución de la concentración de cada enantiómero del ácido (R,S) Ibuprofeno por HPLC con columna quiral (ver III.8.3.). La determinación del rendimiento de la reacción se realizó considerando la disminución de la concentración de cada enantiómero del ácido durante el transcurso de la reacción. Para dicha determinación se hizo una calibración previa obtenida al representar las áreas integradas de cada enantiómero en los cromatogramas correspondientes frente a la concentración de cada isómero (Figura 79). El cálculo de la concentración de cada enantiómero se hizo dividiendo entre dos la concentración total de ácido utilizado. En la Figura 79 se representa la recta de calibrado, que resultó ser la misma para los dos enantiómeros, dado que el ácido de partida es una mezcla racémica.

área enantiómero



$$\text{área enantiómero} = (1,2 + 0,02)10E+7 * [M] + (3,3 + 0,5)10E+5$$

N= 58	R= 0,979
t tab.= 1,67	t exp.= 51,2
F tab.= 2,79	F exp.= 2625

Figura 79: Recta de calibrado para determinar la concentración de cada enantiómero del (R,S) Ibuprofeno.

IV.6.1.e.1.- Estudio de la variación de concentración de butanol.

En una primera serie de reacciones se varió la concentración de butanol en un intervalo comprendido entre 0,125M y 1,25M.

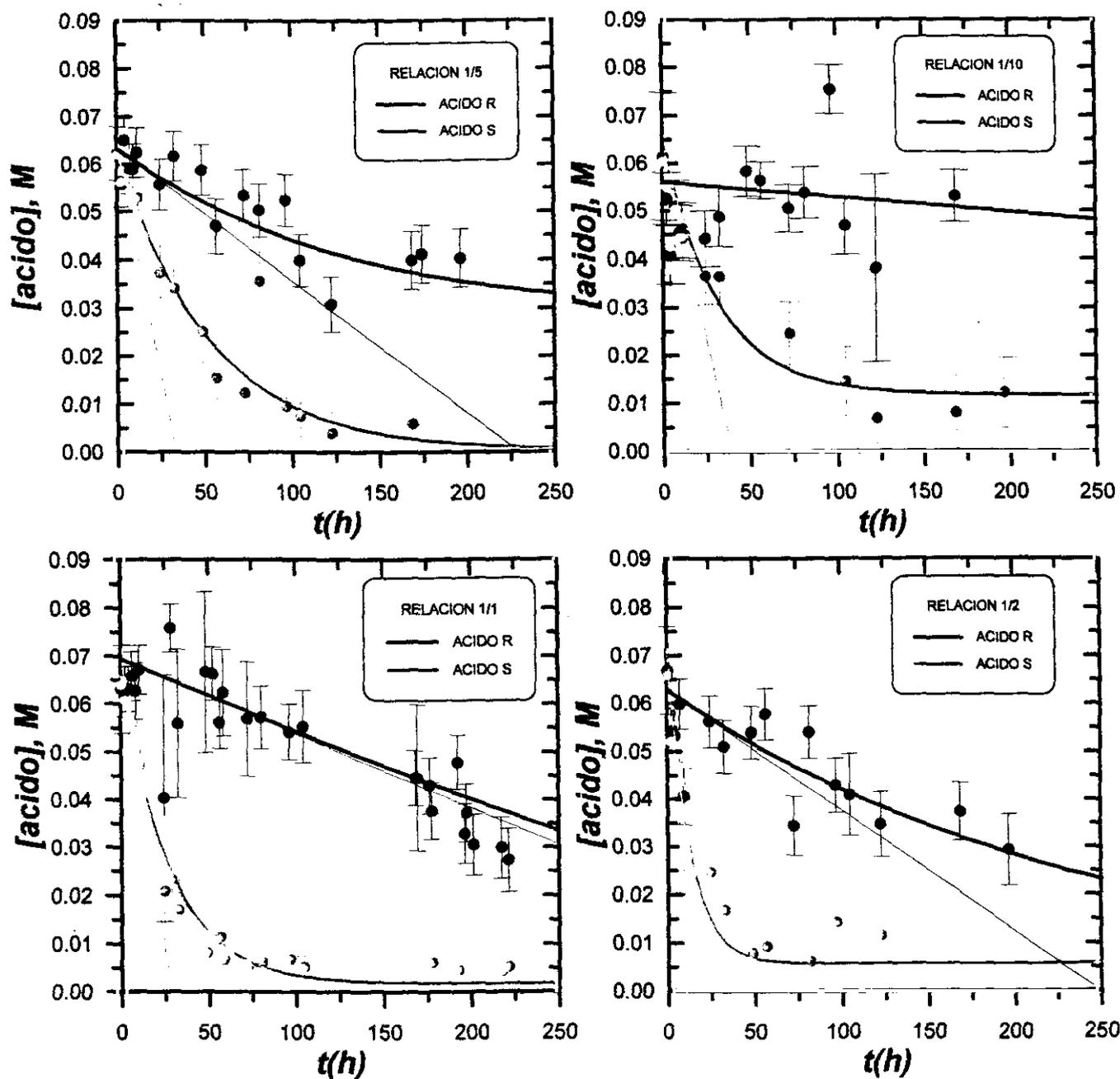


Figura 80: Disminución de la concentración de los enantiómeros R y S del (R,S) Ibuprofeno en el curso de la reacción de esterificación con butanol, catalizada por la lipasa cruda de *Rh.miehei*. Variación relaciones molares ácido/alcohol: 1/1; 1/2; 1/5 y 1/10.

La concentración de (R,S) Ibuprofeno se mantuvo constante a 0,125M; esta serie de reacciones fueron catalizadas por la **lipasa cruda de *Rh.miehei***. Las curvas representadas en la Figura 80, en las que se representa la disminución de la concentración de cada enantiómero del ácido durante la reacción de síntesis del éster butílico se ajustaron a un modelo exponencial decreciente: $[\text{ácido R o S}] = A e^{-kt}$, utilizando el programa EXFIT, dentro del paquete integrado SIMFIT versión 4.0²⁵⁴. De esta forma se calcularon las velocidades iniciales (V_0) de disminución, que se indican también en la Figura 80.

De igual forma, se realizó una serie de reacciones de esterificación con concentraciones variables de butanol, catalizadas por la **lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* (IM20)**, que fueron seguidos con la misma metodología.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 81, en la página siguiente.

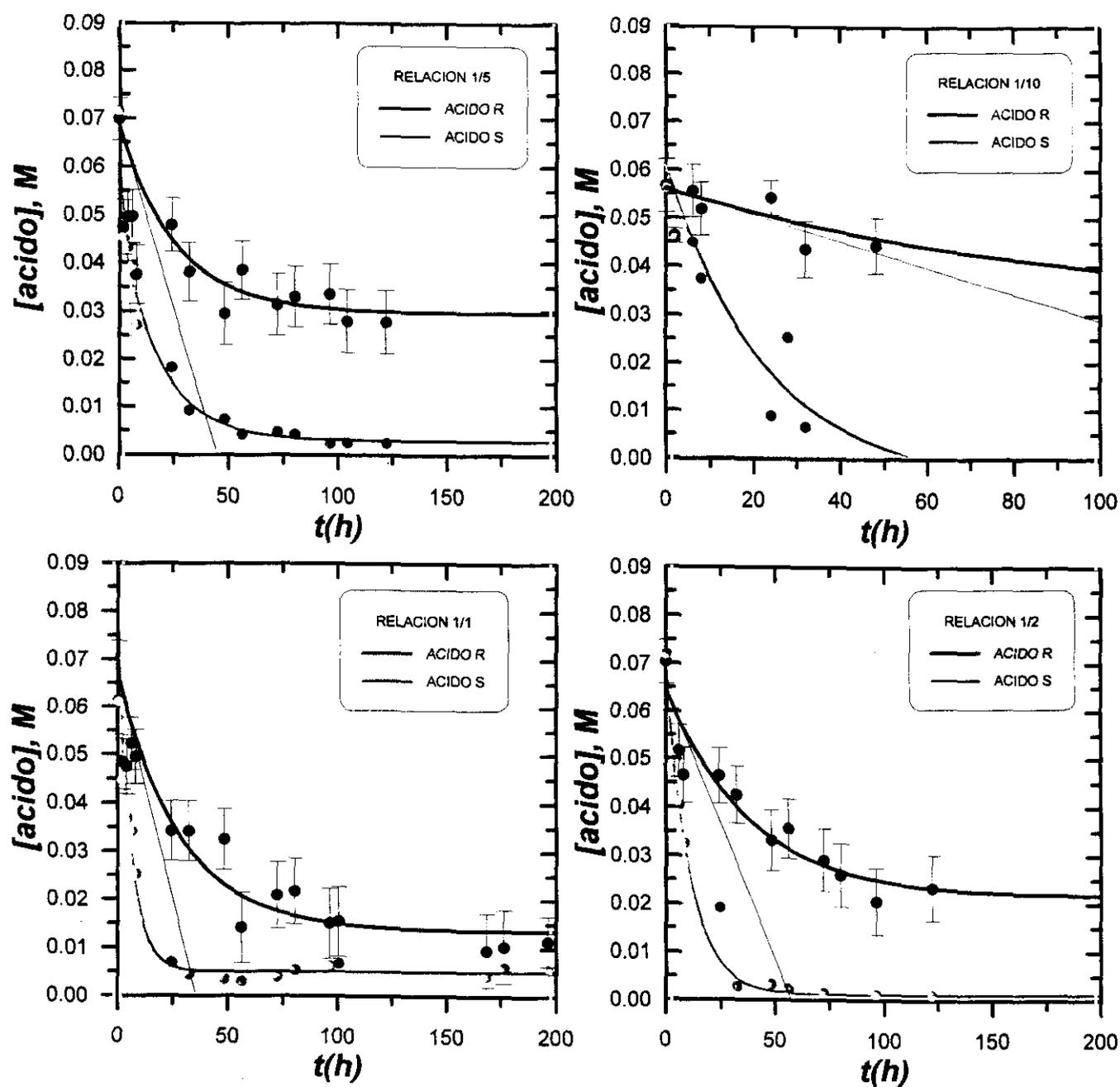


Figura 81: Disminución de la concentración de los enantiómeros R y S del (R,S) Ibuprofeno en el curso de la reacción de esterificación con butanol, catalizada por la lipasa inmovilizada *Rh.miehei* (IM20). Variación relaciones molares ácido/alcohol: 1/1; 1/2; 1/5 y 1/10.

Tal y como se indicó en la sección II.2.5.b.1., al comentar los parámetros de enantioselectividad descritos en la bibliografía se hizo referencia al coeficiente de enantioselectividad (E), que correlaciona las velocidades de conversión de dos enantiómeros de un sustrato en condiciones de primer orden. Este coeficiente, para el estudio llevado a cabo en la presente Tesis Doctoral, correspondería al cociente obtenido al dividir los valores de las velocidades iniciales de esterificación para cada isómero. Los valores obtenidos aparecen en la Tabla 57.

Tabla 57: Velocidades iniciales (Mh^{-1}) de esterificación de dos isómeros del (R,S)-Ibuprofeno, al variar la concentración de butanol. $[(\text{R,S})\text{-Ibuprofeno}]_{\text{inicial}} = 0,125\text{M}$ (constante).

acid/OH	enzima cruda			enzima inmoviliza		
	$V_0(\text{R})$ (Mh^{-1})	$V_0(\text{S})$ (Mh^{-1})	E	$V_0(\text{R})$ (Mh^{-1})	$V_0(\text{S})$ (Mh^{-1})	E
1/1	$(1,51 \pm 0,06)10^{-4}$	$(2,34 \pm 0,08)10^{-3}$	15,5	$(1,9 \pm 0,3)10^{-3}$	$(1,15 \pm 0,01)10^{-2}$	6,0
1/2	$(1,7 \pm 0,2)10^{-4}$	$(5,55 \pm 0,03)10^{-3}$	32,6	$(1,1 \pm 0,4)10^{-3}$	$(6,44 \pm 0,01)10^{-2}$	5,7
1/5	$(1,53 \pm 0,3)10^{-4}$	$(1,2 \pm 0,2)10^{-3}$	7,8	$(1,5 \pm 0,2)10^{-3}$	$(7,8 \pm 0,4)10^{-3}$	5,2
1/10	$(5,7 \pm 0,5)10^{-5}$	$(1,66 \pm 0,02)10^{-3}$	29,1	$(2,7 \pm 0,9)10^{-4}$	$(2,9 \pm 0,08)10^{-3}$	10,7

Tras estudiar los resultados obtenidos, se observa como los efectos inhibitorios del exceso de alcohol se manifiestan fundamentalmente para elevadas concentraciones del mismo (relación 1/10), en el caso del enantiómero R, mientras que para el enantiómero S, sobre el que la esterificación transcurre de forma más enantioselectiva, dichos efectos se observan a menores concentraciones de butanol, concretamente, para la relación 1/5 al utilizar la lipasa cruda y para la relación 1/2 en el caso de la lipasa inmovilizada (IM20). En la bibliografía se recogen²⁹⁶ los efectos inhibitorios del butanol sobre la lipasa inmovilizada, el cual se atribuye al hecho de que se produce la sustitución de moléculas del escudo de agua que rodea a la lipasa por moléculas de butanol, provocando un cambio en la constante dieléctrica del medio y, por tanto, desnaturalizando la enzima.

Del mismo modo, Chulalaksananukul y cols.²⁹⁷ analizaron el efector inhibitorio del exceso de alcohol, etanol en su caso, en la reacción de esterificación del ácido oléico, catalizada por la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* (IM20). Estos autores plantearon el hecho de esta inhibición como resultado de la imposibilidad para formar el complejo acil-enzima.

No obstante, Vazquez y cols.²⁷⁰ no observaron ninguna inhibición por exceso de geraniol en la esterificación del ácido láurico catalizada por Lipozyme[®] IM20.

Tras el estudio realizado en la presente Tesis Doctoral, cuyos resultados se recogen en las Figuras 80 y 81 y en la Tabla 57, se observa, como ya se indicó, que el efecto inhibitor del butanol a elevadas concentraciones es más acusado para la lipasa inmovilizada (IM20). Por otra parte, para la lipasa cruda, un aumento de la concentración al doble (relación 1/2) produce una mejora en la enantioselectividad de la enzima, obteniéndose un incremento del doble en el valor del parámetro de enantioselectividad (E). En condiciones 1/10, el comportamiento enantioselectivo de la lipasa cruda es muy bueno ($E = 29,1$), aunque a costa de perder mucha actividad.

En conclusión, se puede pensar que dado que el paso determinante de la velocidad de reacción es la formación del complejo acil-enzima, se puede suponer que la sustitución de moléculas de agua por butanol en el microentorno del biocatalizador parece favorecer la interacción de la lipasa cruda de *Rh.miehei* con el enantiómero S(+) de Ibuprofeno, hasta una relación de sustratos (1:2), disminuyendo la actividad para concentraciones mayores; mientras que en el caso de la lipasa inmovilizada (IM20) no se observan efectos tan acusados.

IV.6.1.e.2.- Estudio de la variación de la concentración de (R,S) Ibuprofeno.

Además de analizar la influencia de la variación de alcohol en la actividad de la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada se estudió la influencia en el rendimiento de ambas lipasas de la variación de la concentración de ácido.

El procedimiento experimental seguido fue el mismo, pero en esta serie de reacciones no se pudo llevar a cabo la reacción con una concentración de ácido 1,25 M (relación 10/1), catalizada por la lipasa inmovilizada (Lipozyme[®] IM20), porque se formó un aglomerado que impidió el desarrollo normal de la reacción.

En las Figuras 82 y 83 se representa la evolución de las reacciones de esterificación con diferentes concentraciones de (R,S) Ibuprofeno, en un intervalo de concentraciones entre 0,125M y 1,25M, catalizadas por la lipasa cruda de *Rh.miehei* (Figura 82) e inmovilizada (IM20) (Figura 83). En todas estas reacciones se mantuvo constante la concentración de butanol en 0,125M.

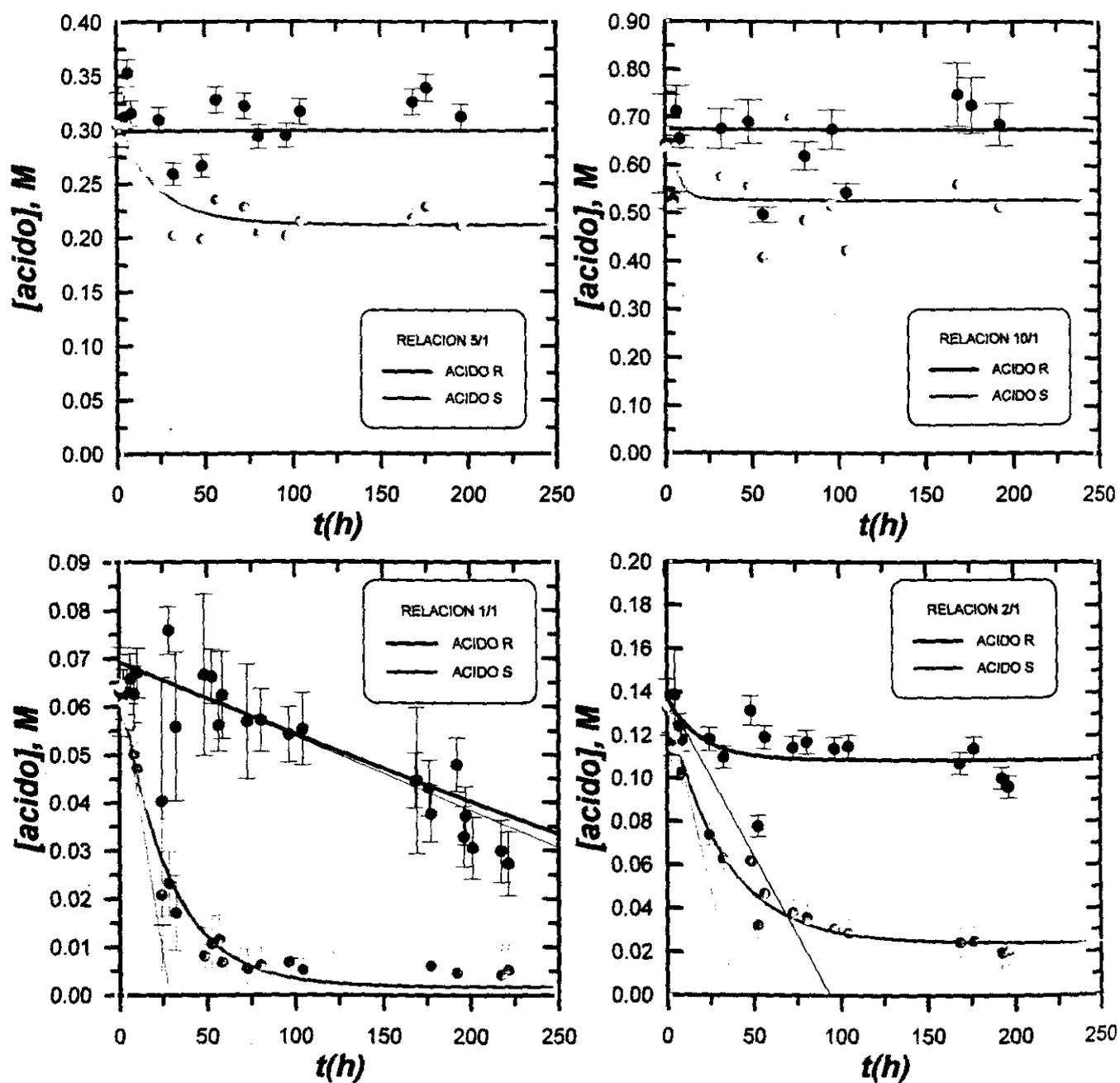


Figura 82: Disminución de la concentración de los enantiómeros R y S del (R,S) Ibuprofeno en el curso de la reacción de esterificación con butanol, catalizada por la lipasa cruda de *Rh.miehei*. Variación relaciones molares ácido/alcohol: 1/1; 1/2; 1/5 y 1/10.

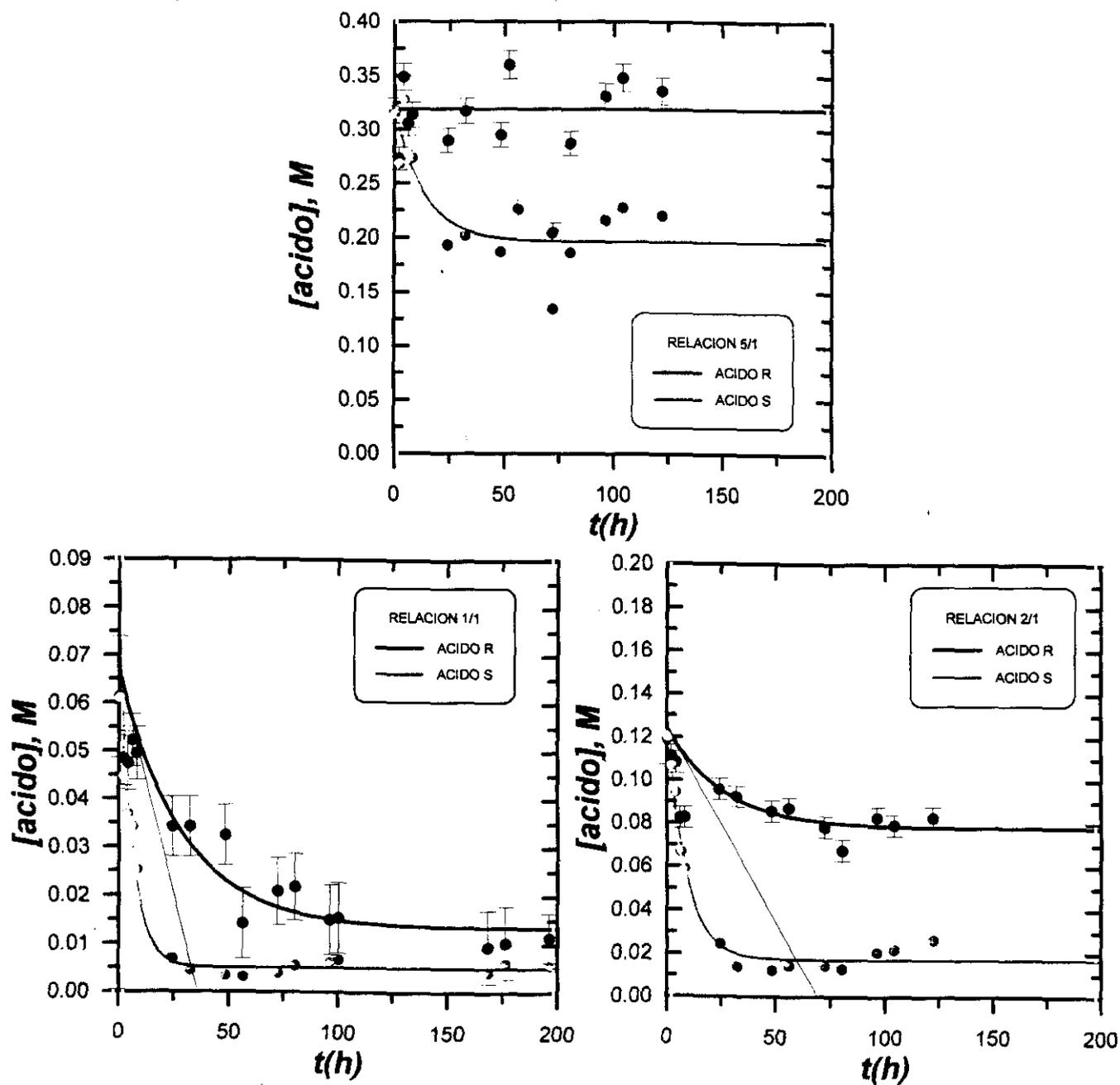


Figura 83: Disminución de la concentración de los enantiómeros R y S del (R,S) Ibuprofeno en el curso de la reacción de esterificación con butanol, catalizada por la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* (IM20). Variación relaciones molares ácido/alcohol: 1/1; 2/1; 5/1.

En esta serie de reacciones también se ajustaron las curvas representadas en las Figuras 83 y 84 a un modelo exponencial simple y se calcularon las velocidades iniciales de desaparición de cada enantiómero del ácido en cada reacción, todo ello con el programa EXFIT. Asimismo, se determinó el coeficiente de enantioselectividad (E) de cada reacción. Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla 58.

Tabla 58: Velocidades iniciales (Mh^{-1}) de esterificación de los dos isómeros del (R,S) Ibuprofeno, variando su concentración inicial. $[butanol]_{inicial} = 0,125M$ (constante).

acid/OH	enzima cruda			enzima inmoviliza		
	$V_0(R)$ (Mh^{-1})	$V_0(S)$ (Mh^{-1})	E	$V_0(R)$ (Mh^{-1})	$V_0(S)$ (Mh^{-1})	E
1/1	$(1,51 \pm 0,06)10^{-4}$	$(2,34 \pm 0,08)10^{-3}$	15,5	$(1,9 \pm 0,3)10^{-3}$	$(1,51 \pm 0,06)10^{-2}$	6,0
2/1	$(1,3 \pm 0,2)10^{-4}$	$(3,43 \pm 0,01)10^{-3}$	26,4	$(1,8 \pm 0,2)10^{-3}$	$(1,51 \pm 0,06)10^{-2}$	7,06
5/1	0	$(4,0 \pm 0,2)10^{-3}$	>100	$(4,7 \pm 0,9)10^{-3}$	$(1,51 \pm 0,06)10^{-3}$	>100
10/1	0	$(4,3 \pm 0,2)10^{-3}$	>100	-----	-----	----

Como puede observarse, para el isómero R el efecto obtenido al aumentar la concentración de (R,S) Ibuprofeno es bastante similar para el caso de la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada (IM20), ya que practicamente deja de ser utilizado por ambas enzimas. Esto es debido a que al estar el ácido en exceso las enzimas utilizan el enantiómero preferente S, sin necesidad de utilizar el otro enantiómero R.

Por otra parte, para el isómero S, sí se observan comportamientos diferentes de las dos enzimas. La enzima inmovilizada (IM20) se inhibe por exceso de ácido a partir de una relación 5/1. Este hecho coincide con los resultados obtenidos por Vazquez y cols.²⁷⁰, que también observaron un efecto inhibitor del ácido en la reacción de esterificación del ácido láurico con geraniol, catalizada por la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* (Lipozyme® IM20). No obstante, la enzima cruda no es inhibida por el exceso de ácido.

Para visualizar mejor los resultados obtenidos en todas las reacciones estudiadas (en la serie de variación de ácido y en la serie de variación de alcohol) catalizadas por la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada (IM20) se realizó la Figura 84, en la que se recoge de forma conjunta los datos expuestos en la Tablas 57 y 58.

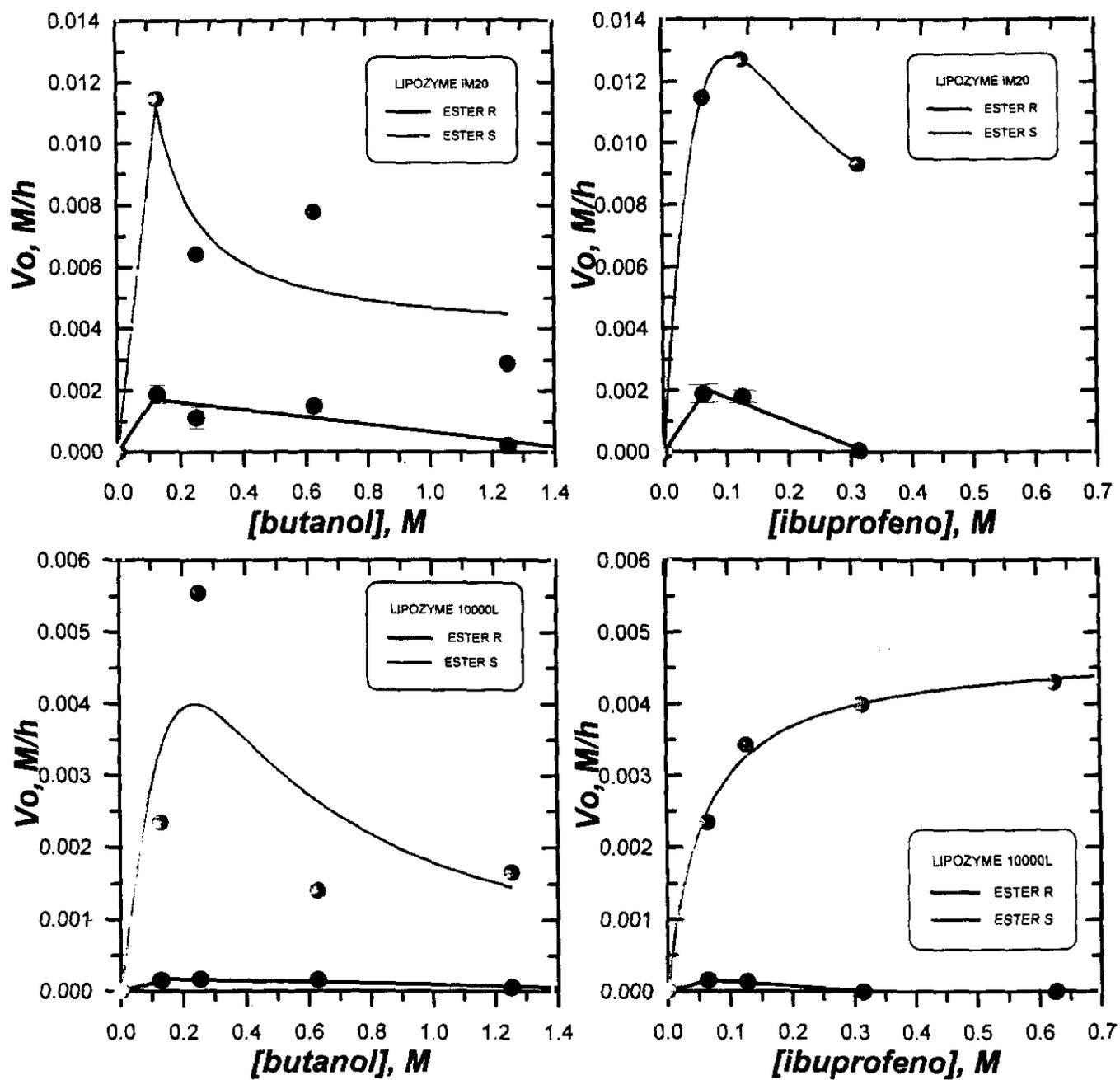


Figura 84: Representación de la velocidad inicial de cada reacción frente a la concentración del sustrato cuya concentración varía.

Como puede observarse en la Figura 84, para la enzima cruda al aumentar la concentración inicial de (R,S) Ibuprofeno se observa un aumento de la velocidad inicial de esterificación del S(+) Ibuprofeno, con un comportamiento perfectamente michaeliano, por lo que se calcularon las correspondientes constantes cinéticas ($V_{max} = (4,7 \pm 0,1) 10^{-3} \text{ Mh}^{-1}$ y $K_M = (5,7 \pm 0,6) 10^{-2} \text{ M}$)

Se logra así un gran aumento de la enantioselectividad de la lipasa cruda de *Rh.miehei* para altas concentraciones de ácido ($E > 100$), pero de forma diferente a la serie de reacciones de variación de la concentración de alcohol, pues en este caso tanto la enzima cruda como la inmovilizada mantienen su actividad muy elevada.

Como conclusión de este apartado es de destacar el gran aumento de la enantioselectividad y conversión logrado para las reacciones catalizadas por la lipasa cruda de *Rh.miehei* al aumentar la concentración inicial de ácido. Este efecto no es tan acusado para la enzima inmovilizada IM20, puesto que existe un efecto inhibitorio al aumentar la concentración de ácido, lo cual puede ser debido a problemas de solubilidad en condiciones 5/1 y que imposibilitó el desarrollo de la reacción de relación de sustratos 10/1

IV.6.2.- ESTUDIO DE LAS VARIABLES CONTINUAS O ESTRUCTURALES

Las variables continuas o estructurales analizadas fueron :

- a).- el disolvente orgánico
- b).- los sustratos: el alcohol
 el ácido (R,S) 2-arilpropionico

Para este estudio se utilizó la metodología OVAT, según la cual se modifica una variable, la que es objeto de estudio, mientras las demás permanecen constantes.

Asimismo, se analizó la influencia de la variación de estas variables tanto en el rendimiento de la reacción estándar de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno, como en la enantioselectividad de dicha reacción.

IV.6.2.a.- Influencia de la naturaleza del DISOLVENTE ORGANICO.

De acuerdo con lo indicado en la bibliografía (ver II.2.6.) se eligió como disolvente de la reacción estándar de síntesis de ésteres un disolvente apolar, el ciclohexano ($\log P = 3,2$), ya que se ha comprobado que las lipasas requieren un medio fuertemente apolar ($\log P > 2$) para mantener la capa de agua esencial para el mantenimiento de su conformación nativa y, por tanto, de su actividad²⁹⁸.

IV.6.2.a.1.- Influencia en el rendimiento.

Asimismo, se analizó la influencia de la naturaleza del disolvente orgánico en la actividad de la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada, relacionando los resultados obtenidos en estas reacciones con dos parámetros físicos de los disolventes orgánicos; el $\log P$, parámetro de polaridad, que se define como el coeficiente de partición en un sistema octanol/agua²⁹⁹ y el Volumen molar (V_m), parámetro estérico que equivale al volumen, expresado en litros, que ocupa un mol de disolvente. Este último parámetro indica la capacidad de solvatación de un determinado disolvente²⁹⁹ (Tabla 59).

Tabla 59: Disolventes orgánicos utilizados, valor de sus correspondientes $\log P$ y volumen molar (V_m) y rendimiento de las reacciones de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno en cada disolvente (72h).

DISOLVENTE	$\log P$	V_m	enz.cruda (rend %)	enz.inmov (rend %)
dimetilformamida	-1,0	0,08	0	0
dioxano	-0,4	0,09	0	0
acetonitrilo	-0,33	0,13	0	0
isobutilmetilceto	1,4	0,05	0	0
diisopropiléter	2,03	0,14	11,5±0,7	42±2
1,1,1-tricloroetano	2,49	0,10	62±2	54±1
tolueno	2,5	0,11	74±1	57±2
ciclohexano	3,2	0,11	65±1	66±1
hexano	3,5	0,13	54±4	72±1
heptano	4,0	0,15	50±3	42,9±0,3
iso-octano	4,5	0,17	49±2	73±1

Para analizar la influencia de cada parámetro en el rendimiento de la reacción se utilizó el programa estadístico STATGRAPH²⁶⁹; obteniéndose las correspondientes matrices de correlación (Tablas 60 A y B):

Tablas 60: Matrices de correlación de los rendimientos de la lipasa cruda (A) e inmovilizada (B) de *Rh.miehei*.

enzima cruda				enzima inmovilizada (IM20)			
	rend.	logP	V _M		rend.	logP	V _M
rend.	1	0,79	0,38	rend.	1	0,89	0,61
logP		1	0,82	logP		1	0,82
V _M			1	V _M			1

El parámetro más influyente en la actividad sintetasa de ambas lipasas es el logP, parámetro que determina el grado de polaridad de cada disolvente orgánico.

A continuación, se hizo un ajuste por regresión lineal de dicho parámetro con los valores de rendimiento obtenidos para cada lipasa. Las ecuaciones de las rectas son las siguientes:

I).- Ajuste rendimiento - logP del disolvente.

I.a.- lipasa cruda de *R.miehei*

$$\text{rendimiento (\%)} = (13 \pm 2) \log P + (8 \pm 5) \quad [36]$$

$$\begin{aligned} n &= 33 & R &= 0,613 \\ t_{\text{exp}} &= 7 & t_{1,31} (\alpha=0,05) &= 1,70 \\ F_{\text{SND}_{\text{exp}}} &= 49 & F_{1,31} (\alpha=0,05) &= 2,89 \end{aligned}$$

I.b.- lipasa inmovilizada de *R.miehei*

$$\text{rendimiento (\%)} = (15 \pm 1) \log P + (8 \pm 3) \quad [37]$$

$$\begin{aligned} n &= 33 & R &= 0,793 \\ t_{\text{exp}} &= 11 & t_{1,31} (\alpha=0,05) &= 1,70 \\ F_{\text{SND}_{\text{exp}}} &= 118 & F_{1,31} (\alpha=0,05) &= 2,89 \end{aligned}$$

En las Figuras 85 A y B se representan las rectas, límites de confianza y límites de predicción obtenidos en el ajuste por regresión lineal del rendimiento de cada lipasa en la reacción de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno frente al logP de los disolventes analizados.

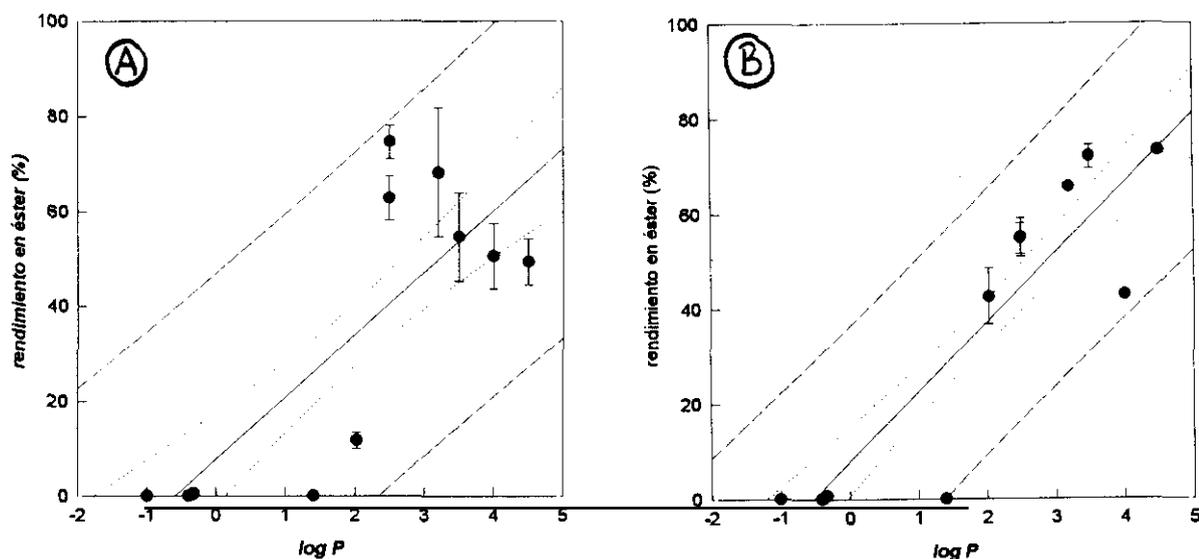


Figura 85: Ajuste por regresión lineal de la actividad de las lipasas cruda (A) e inmovilizada (B) de la lipasa de *Rh.miehei* frente al log P de los disolventes analizados.

Tras analizar la influencia de la polaridad de diferentes disolventes en la actividad de la lipasa de *Rh.miehei* libre e inmovilizada se obtuvo una mejor correlación ($R = 0.793$) para la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei*, ya que la actividad sintetasas de esta enzima está directamente relacionada con el caracter apolar del disolvente. Esta correlación fue menor para la lipasa cruda ($R = 0,613$), ya que la máxima actividad se alcanzó con el tolueno ($\log P = 2,5$), y fue disminuyendo ligeramente al aumentar el caracter apolar del medio.

Tanto la lipasa libre como la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* fueron inactivas con disolventes polares (dimetilformamida, dioxano, isobutilmetilcetona y acetonitrilo), con logP inferior a 2; ya que estos disolventes extraen el agua esencial de la lipasa, provocando la alteración de la conformación nativa de la proteína³⁰⁰. Estos resultados coinciden con lo indicado por Miller³⁰¹ y Svanholm²⁸⁵ en la reacción de síntesis del miristato de propilo y Manjón²⁸⁷ en la síntesis del butirato de etilo. Estos autores trabajaron con la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* y observaron una marcada diferencia en la actividad de dicha

enzima en función de la naturaleza del disolvente, ya que pasaba de ser prácticamente inactiva con disolventes apolares y muy activa con los disolventes más apolares.

IV.6.2.a.2.- Influencia en la enantioselectividad .

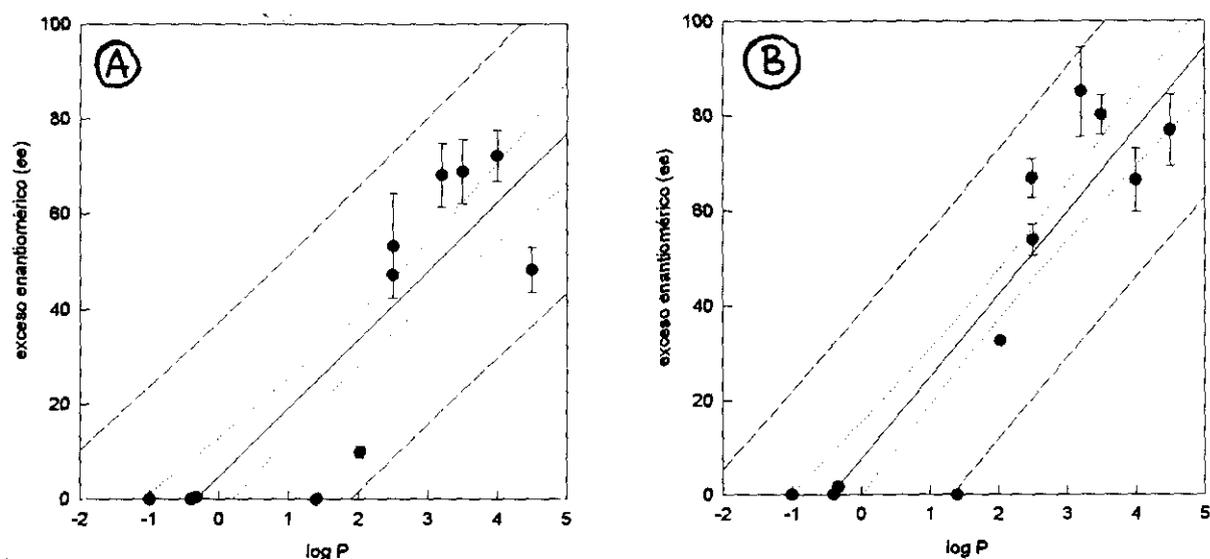
A continuación, se analizó la influencia de la naturaleza del disolvente orgánico en la enantioselectividad de la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada. Estos resultados y los parámetros físicos de cada disolvente logP y V_m se muestran en la Tabla 61.

Tabla 61: Disolventes orgánicos utilizados, valor de sus correspondientes logP y volumen molar (V_m) y rendimiento de las reacciones de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno en cada disolvente (72h).

DISOLVENTE	logP	V_m	enz.cruda (ee %)	enz.inmov. (ee %)
dimetilformamida	-1,0	0,08	0	0
dioxano	-0,4	0,09	0	0
acetonitrilo	-0,33	0,13	0	0
isobutilmetilceto	1,4	0,05	0	0
diisopropiléter	2,03	0,14	9.9±0,5	32,6±0,3
1,1,1-tricloroetano	2,49	0,10	47,2±0,2	67±1
tolueno	2,5	0,11	53±4	54±1
ciclohexano	3,2	0,11	68±3	85±4
hexano	3,5	0,13	68±3	80±1
heptano	4,0	0,15	72±2	66±2
iso-octano	4,5	0,17	48±2	77±3

Utilizando el programa estadístico STATGRAPH²⁶⁹ se obtuvieron las siguientes matrices de correlación (Tablas 62 A y B):

analizados.



Figuras 86: Ajuste por regresión lineal de la actividad de las lipasas cruda (A) e inmovilizada (B) de la lipasa de *Rh.miehei* frente al log P de los disolventes analizados.

Analizando los resultados obtenidos con los disolventes más apolares ($\log P$ mayor de 2,49) se observa que el comportamiento de estas dos enzimas es similar. En el caso de la lipasa inmovilizada (Lipozyme[®] IM20) se produce un aumento del rendimiento y la enantioselectividad de la reacción con la polaridad de los disolventes, coincidiendo con lo indicado por los autores anteriormente citados^{285,287,301}. La lipasa cruda (Lipozyme[®] 10000L), cuyo comportamiento con distintos disolventes no ha sido estudiado anteriormente, alcanza su máxima enantioselectividad con el tolueno ($\log P = 2,5$), descendiendo ligeramente con los disolventes más apolares. Por el contrario, el valor del exceso enantiomérico, parámetro que determina el grado de enantioselectividad alcanzado, alcanza sus valores máximos con los disolventes más apolares. Estos resultados parecen indicar que la lipasa de *R.miehei* es más enantioselectiva con los disolventes más apolares ($\log P > 3$), por lo que el rendimiento se mantiene en torno al 50%, ya que solo reconoce uno de los enantiómeros. Con el disolvente más apolar (isooctano; $\log P = 4,5$) se produce una disminución drástica de la enantioselectividad para la lipasa cruda, debido a problemas difusionales que dificultan el acceso de los sustratos al centro activo de la lipasa enzima.

El disolvente utilizado en la reacción estándar de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno fue el ciclohexano ($\log P = 3,2$), disolvente apolar intermedio, con el que se obtuvieron muy buenos resultados tanto de rendimiento como de enantioselectividad con las dos lipasas y que además fueron similares para ambas lipasas.

Para analizar la influencia en el proceso de la naturaleza de los ácidos (R,S) 2-arilpropiónicos se utilizó el diisopropiléter, debido a la necesidad de utilizar un disolvente en el que se solubilizaran estos ácidos y la lipasa de *Rh.miehei* fuera activa.

IV.6.2.b.- Influencia de la CADENA ALCOHOLICA

Con el fin de analizar la influencia de la naturaleza del alcohol en la actividad de la lipasa de *Rh.miehei*. Se llevó a cabo la reacción estándar de síntesis de ésteres de (R,S) Ibuprofeno variando el tipo del alcohol utilizado.

IV.6.2.b.1.- Influencia en el rendimiento de la reacción

Si se asume la formación de un complejo intermedio acil-enzima durante la reacción de síntesis de ésteres, el rendimiento final de la reacción dependerá de la accesibilidad del nucleófilo (alcohol, en este caso) al enlace acil-enzima; de ahí la influencia de la naturaleza del alcohol en el rendimiento de estas reacciones.

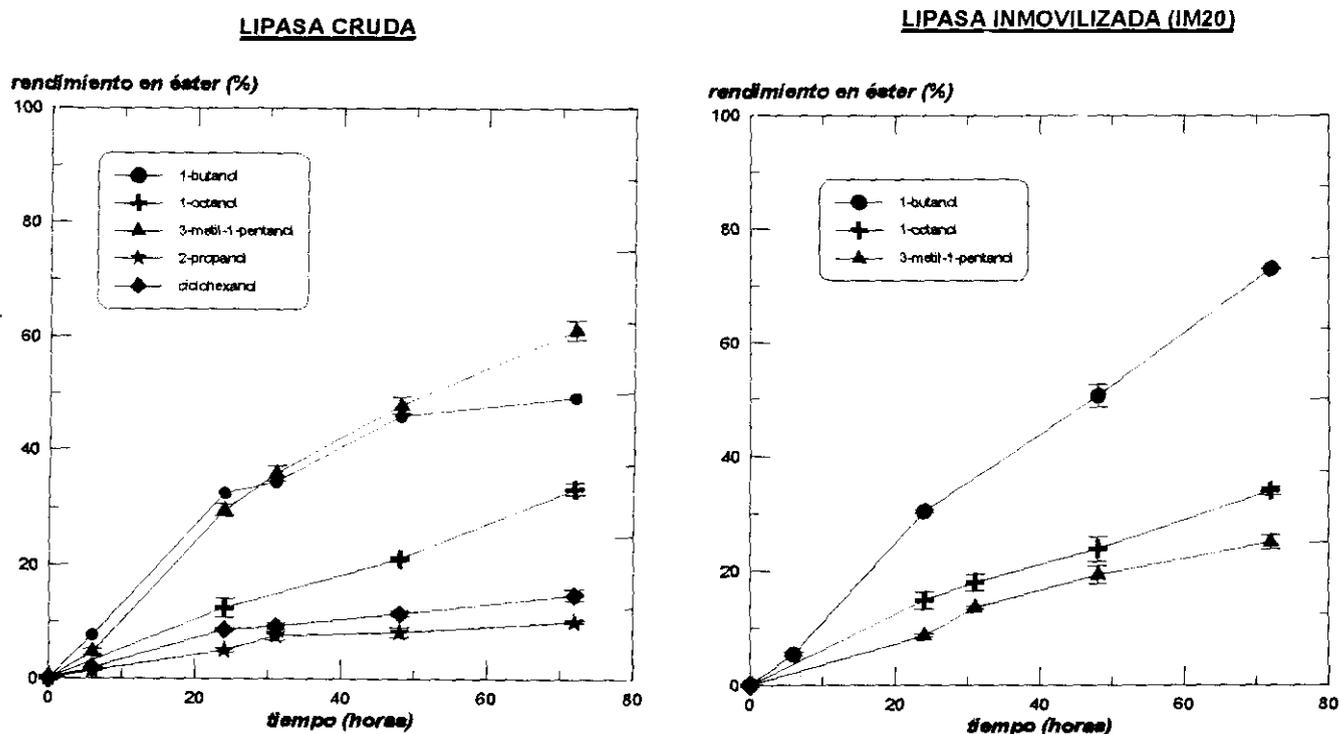
En la Tabla 63 aparecen los rendimientos finales (72h) de cada reacción, expresados en porcentaje de éster sintetizado y en actividad específica (mmol éster sintetizados/mg de proteína).

Tabla 63: Actividad de la lipasa cruda e inmovilizada de *R.miehei* en la reacción de esterificación del (R,S) Ibuprofeno con diversos alcoholes (72h).

ALCOHOL	enzima cruda		enzim inmovil	
	rend (%)	mmol/mg prot. (*)	rend (%)	mmol/mg prot. (*)
1-butanol	49±2	0,024	73±1	0.025
3-metil-1-butanol	61±2	0,029	25±1	0.009
1-octanol	33±1	0,016	34±1	0.012
2-propanol	10±0,1	0,005	0	0
ciclohexanol	15±1	0,007	0	0

(*) actividad expresada en mmoles éster sintetizado/mg proteína

En la Figuras 87 A y B se muestra el resultado obtenido con cada alcohol a distintos tiempos de reacción.



Figuras 87: Rendimiento de la reacción de esterificación del (R,S) Ibuprofeno con distintos alcoholes, catalizada por la lipasa cruda (A) e inmovilizada (B) de *Rh.miehei*.

Las lipasas específicas, como la lipasa de *R.miehei*, catalizan las reacciones de esterificación preferentemente con alcoholes primarios, mientras que su actividad es muy pobre con alcoholes secundarios y, al igual que todas las lipasas, no es activa con alcoholes terciarios³⁰². Por esta razón, en este estudio de la influencia del alcohol en la actividad de la lipasa cruda e inmovilizada de *R.miehei* se analizaron diversos alcoholes primarios de diferente longitud (1-butanol y 1-octanol) y ramificado (3-metil-1-butanol); alcoholes secundarios alifático (2-propanol) y cíclico (ciclohexanol), pero no se analizaron alcoholes terciarios.

En las Figuras 87 A y B se observa que la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* (Lipozyme[®] IM20) no es activa con los alcoholes secundarios utilizados, mientras que la

lipasa cruda presenta una actividad muy baja con dichos alcoholes, en relación con la actividad obtenida con los alcoholes primarios. Resultados análogos han sido descritos por Svanholm²⁸⁵ en la reacción de esterificación del ácido mirístico, donde obtuvo rendimientos del 90% con los alcoholes primarios ensayados y rendimientos del 10% con los alcoholes secundarios.

Los alcoholes primarios estudiados presentan más de cuatro átomos de carbono, ya que los alcoholes primarios de cadena corta como el etanol, debido a su alta hidrofília ($\log P = -0,24$), ejerce un efecto deshidratante sobre la lipasa, disminuyendo su actividad^{287,303}.

Entre los alcoholes primarios, tanto con la lipasa cruda como con la inmovilizada, los mejores resultados se obtuvieron con 1-butanol y los peores con 1-octanol, debido a la disminución de la actividad de la lipasa de *Rh.miehei* al aumentar la longitud de la cadena alcohólica.

Miller³⁰¹ tras analizar la actividad de la lipasa inmovilizada de *Rh.miehei* (Lipozyme® IM20) en la reacción de esterificación del ácido mirístico con diferentes alcoholes primarios (con radicales alquílicos y aromáticos en la posición β , con grupos funcionales polares en esa misma posición y diversos alcoholes con insaturaciones y grupos aromáticos en su cadena), llegó a la conclusión de que esta enzima admite una gran variedad de sustratos alcohólicos debido a que su centro activo está rodeado de una gran zona hidrófoba. Por tanto, los sustratos más apolares presentarán una gran afinidad por esta región, favoreciendo el desarrollo de las reacciones de esterificación. No obstante, estas conclusiones deben matizarse tras analizar los resultados representados en las Figuras 87 A y B, dado el menor rendimiento obtenido con el 1-octanol ($\log P = 2,90$) respecto al 1-butanol ($\log P = 0,80$), a pesar de su carácter más apolar, lo que indica que la longitud de la cadena de los alcoholes primarios es un factor más influyente en la actividad de la lipasa de *Rh.miehei* que la polaridad de los alcoholes.

Tras este estudio se observó que el alcohol más adecuado para la lipasa de *Rh.miehei*, tanto cruda como inmovilizada, es el 1-butanol, ya que con este alcohol se alcanzaron elevados y semejantes valores de actividad específica para ambas lipasas: 0,024 mmol/mg con la lipasa cruda y 0,025 mmol/mg con la lipasa inmovilizada.

IV.6.2.b.2.- Influencia en la enantioselectividad

Además de analizar la influencia de la naturaleza del alcohol en el rendimiento de la reacción de esterificación del (R,S) Ibuprofeno se estudió su influencia en la enantioselectividad de dichas reacciones.

En la Tabla 64 aparecen los resultados de exceso enantiomérico (ee) y rendimiento en éster (%), obtenidos al final de cada reacción (72 h).

Tabla 64: Enantioselectividad de la lipasa cruda e inmovilizada de *Rh.miehei* en la reacción de esterificación del (R,S) Ibuprofeno con diversos alcoholes (72h).

ALCOHOL	enzima cruda			enzima inmov		
	rend (%)	ee (%)	FE	rend (%)	ee (%)	FE
1-butanol	49±2	48±2	0,5	73±1	77±3	0,3
3-metil-1-butanol	61±2	79±2	0,5	25±1	59±2	1,8
1-octanol	33±1	43±1	0,8	34±1	76±3	1,5
2-propanol	10±0,1	0,40±0,01	0,03	0	---	---
ciclohexanol	15±1	3±0,1	0,1	0	---	---

La enantioselectividad alcanzada en cada reacción está directamente relacionada con el rendimiento obtenido, ya que las reacciones de mayor rendimiento son también las de mayor enantioselectividad. De ahí que los valores de exceso enantiomérico obtenidos con los alcoholes primarios sean muy superiores a los obtenidos con los alcoholes secundarios.

Los datos de factor de enantioselectividad (FE) obtenidos con cada alcohol no son comparables, ya que en algunas reacciones a las 72h de reacción se ha sobrepasado el 50% de conversión, mientras que en otras todavía no se ha alcanzado.

El 1-butanol fue el alcohol con el que se obtuvieron mejores resultados con ambas lipasas, por lo que se utilizó en la reacción estándar de esterificación.

IV.6.2.c.- Influencia del ACIDO (R,S) 2-ARILPROPIÓNICO

A continuación se llevó a cabo la síntesis enantioselectiva de los ésteres butílicos de diferentes ácidos (R,S) 2-arylpropiónicos, catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada. Debido a la escasa solubilidad de estos sustratos, se utilizó un disolvente lo suficientemente apolar como para que la lipasa de *Rh.miehei* pudiera desarrollar su actividad y lo suficientemente polar, como para que todos los ácidos estudiados fueran solubles; el disolvente utilizado que reunía todas estas características es el diisopropiléter (logP = 2,03).

El Naproxeno es el ácido S(+)-2-(6-metoxi-2-naftil)propiónico, pero en esta sección y con el fin de simplificar la nomenclatura utilizada, se engloba dentro de la denominación de Naproxeno a los dos enantiómeros R(-) y S (+) del ácido (R,S) 2-(6-metoxi-2-naftil)propiónico.

IV.6.2.c.1.- Influencia en el rendimiento de la reacción.

En la Figura 88 A y B se representa la evolución de la reacción de síntesis del éster butílico de cada ácido (R,S) 2-arylpropiónico frente al tiempo.

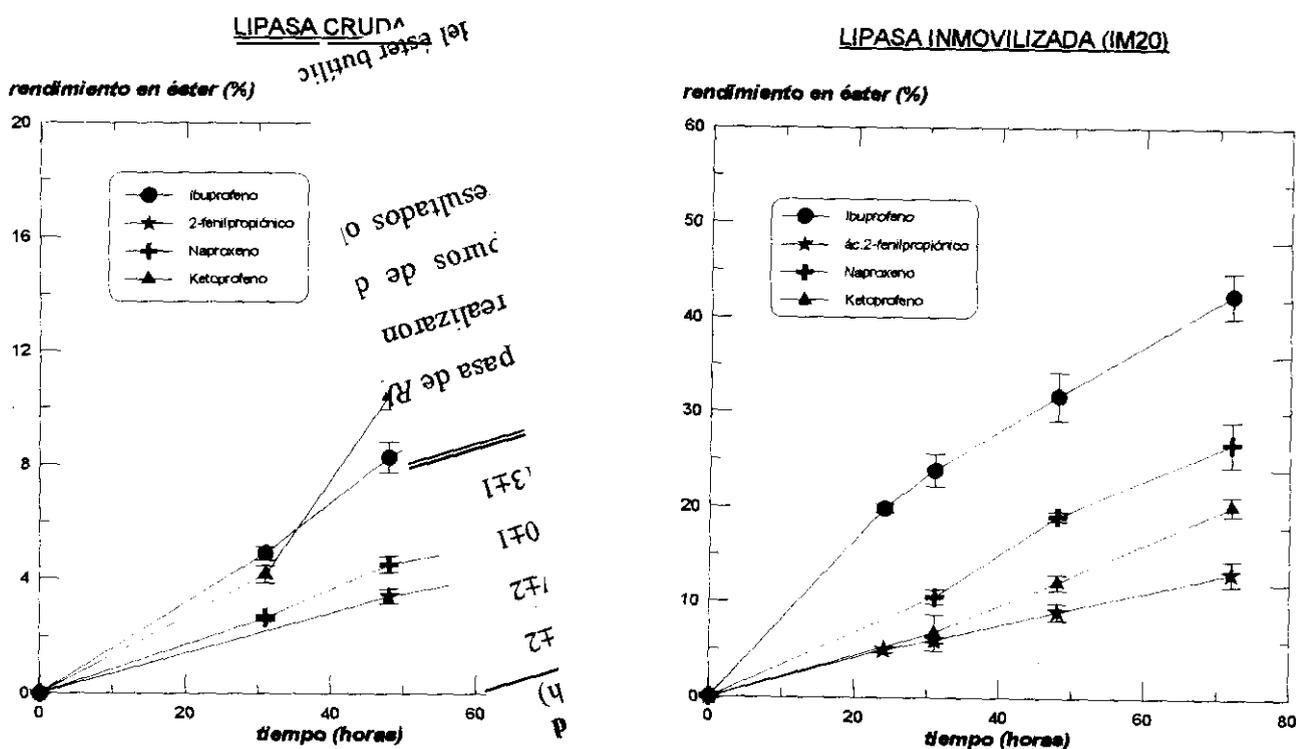


Figura 88: Evolución de la reacción de síntesis del éster butílico de diferentes ácidos (R,S) 2-arylpropiónicos, catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* cruda (A) e inmovilizada (B).

Las curvas de la Figura 88 se ajustaron a un modelo exponencial creciente y se calculó la velocidad inicial de cada reacción utilizando el programa EXFIT, del paquete estadístico SIMFIT versión 4,0. En la Tabla 64 se recogen los resultados de velocidad inicial (mmoles ester sintetizado/hora) obtenidos en cada reacción; así como los valores de logP de cada ácido (R,S) 2-arilpropiónico estudiado.

Tabla 64: Velocidad inicial de las reacciones de síntesis de los ésteres butílicos de diferentes ácidos (R,S) 2-arilpropiónicos, catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada y logP de cada ácido.

ACIDO	log P del ácido	enzima cruda		enzima inmovi	
		V ₀ (mmol ester/h)	enant	V ₀ (mmol ester/h)	enant
IBUPROFENO	3,74	(2,04±0,3) 10 ⁻³	S	(7,4±0,8) 10 ⁻³	S
NAPROXENO	2,83	(1,0±0,1) 10 ⁻³	S	(4,7±0,3) 10 ⁻³	S
KETOPROFENO	2,66	(2,5±0,1) 10 ⁻³	R	(3,4±0,3) 10 ⁻³	R
Ac. 2-fenilpropionico	1,84	(8,1±0,7) 10 ⁻⁴	S	(2,3±0,2) 10 ⁻³	S

(enant) enantiopreferencia.

De los datos de la Tabla anterior se puede deducir que la reactividad relativa de los tres ácidos cuyo enantiómero S(+) se esterifica preferentemente es la misma para la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada



siendo la diferencia de reactividad mayor con la lipasa inmovilizada que con la enzima cruda.

Esta reactividad relativa puede relacionarse, en principio, con el logP de cada ácido, de forma que el ácido más lipófilo ((R,S) Ibuprofeno) difunde mejor en el medio de reacción (diisopropiléter) hacia el centro activo de la enzima.

En el caso del (R,S) Ketoprofeno, que presenta una enantioselectividad opuesta, hacia el enantiómero R, es relativamente más reactivo que los otros ácidos para las reacciones catalizadas por la lipasa cruda de *Rh.miehei*. Esta situación es opuesta en las reacciones catalizadas por la lipasa inmovilizada (IM20). No obstante, el (R,S) Ketoprofeno es poco

reactivo en ambos casos.

IV.6.2.c.2.- Influencia en la enantioselectividad.

En la Tabla 65 se recogen los valores de los parámetros de enantioselectividad (ee y FE) obtenidos en las reacciones de síntesis de los ésteres butílicos de diversos ácidos (R,S) 2-arilpropiónicos.

Tabla 65: Enantioselectividad de las reacciones de síntesis de los ésteres butílicos de los ácidos (R,S) 2-aril propiónicos, catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada.

ACIDO	logP	enzima cruda			IM20		
		rend (72h)	ee	FE	rend (72h)	ee	FE
IBUPROFEN	3,74	11,6±0,7	10±0,1	13,12	42±2	32±1	72,41
NAPROXEN	2,83	5,7±0,8	1,05±0,06	6,04	27±2	7,1±0,3	36,98
KETOPROFE	2,66	13,8±0,9	9±1	16,01	20±1	9,5±0,2	25,0
2fenilpropi	1,84	4,5±0,3	26±1	4,71	13±1	8,5±0,1	14,94

Para comprobar que la enantioselectividad de la lipasa de *Rh.miehei* tanto cruda como inmovilizada varió con respecto al Ketoprofeno, se realizaron una serie de reacciones utilizando como sustratos los enantiómeros R y S puros de dicho ácido, manteniendo constantes todas las condiciones de la reacción. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 66.

Tabla 66: Rendimiento de la reacción de síntesis del éster butílico de Ketoprofeno, utilizando como sustratos los enantiómeros R y S puros de dicho ácido.

t (h)	enzima cruda		IM20	
	R	S	R	S
170	22±1	0	48±2	7,3±0,3
263	30±2	----	60±2	15±0,7
408	----	4,5±0,2	----	20±1

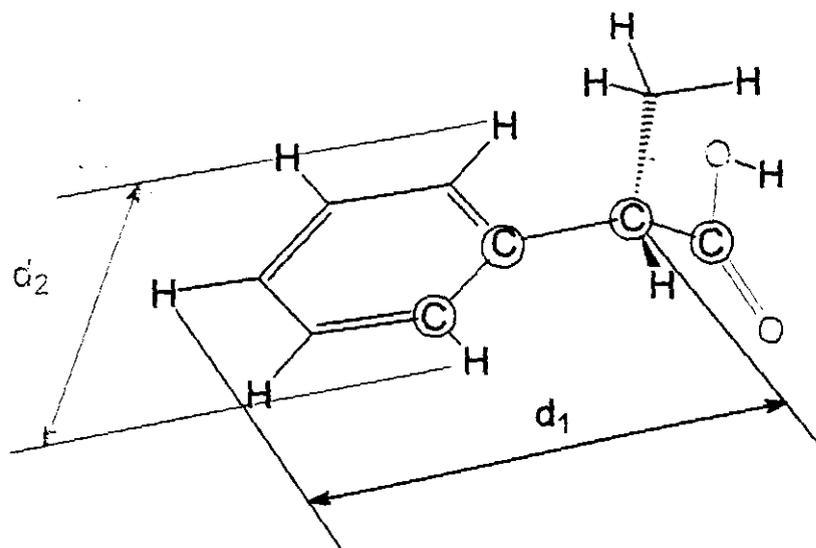
Como se observa en la Tabla 66 el rendimiento de la reacción de síntesis del éster butílico del enantiómero S de Ketoprofeno fue muy bajo, mientras que en la reacción de esterificación del isómero R el rendimiento obtenido fue muy superior en las dos series de reacciones, catalizadas por la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada (IM20), respectivamente.

Tras la realización de las reacciones con los enantiómeros puros de Ketoprofeno quedó confirmado que la enantioselectividad de la lipasa de *Rh.miehei* es diferente en el caso del (R,S) Ketoprofeno, ya que actúa selectivamente sobre el isómero R, mientras que para los otros ácidos (R,S) 2-arilpropiónicos estudiados reconoce preferentemente el isómero S.

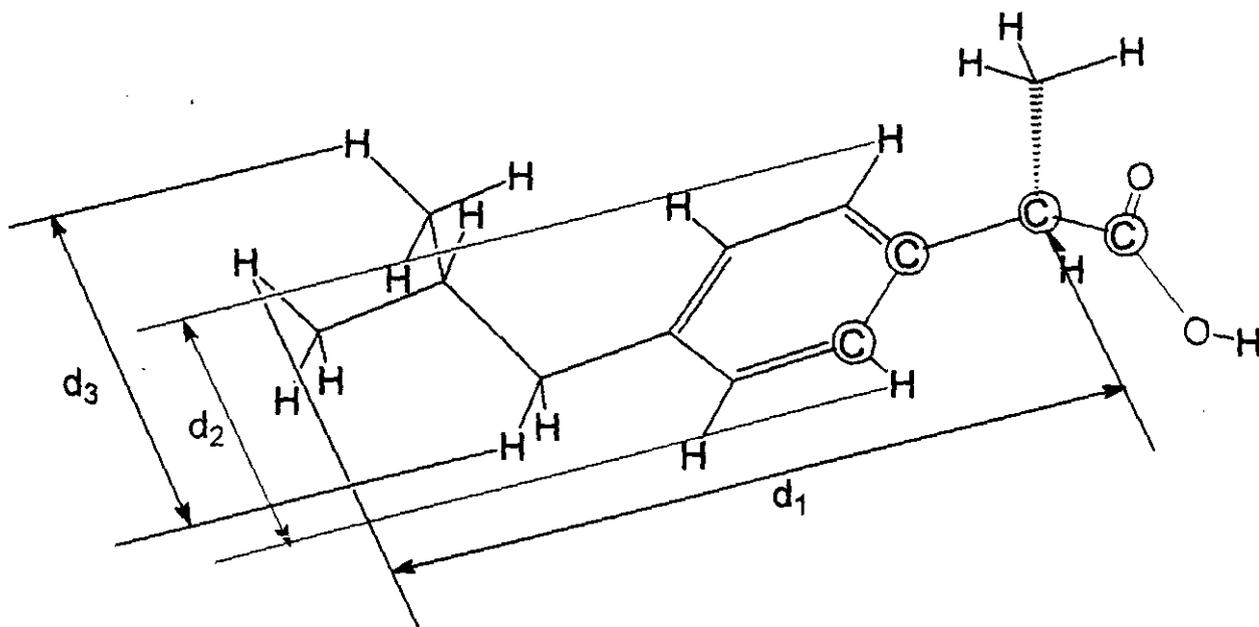
Como ya se indicó en la sección IV.4.2., la información recogida en la bibliografía acerca de la enantioselectividad de la lipasa de *Rh.miehei* para los ácidos (R,S) 2-arilpropiónicos es bastante contradictoria. Algunos autores como Sih y cols.^{240,246} observaron un comportamiento enantioselectivo de la lipasa de *Rh.miehei* hacia el isómero R del (R,S) Ibuprofeno. Sin embargo, otros autores²⁴¹ detectaron una marcada enantioselectividad por el enantiómero S de este mismo sustrato. Este diferente comportamiento de la lipasa de *Rh.miehei* sobre el mismo sustrato, como se comentó anteriormente, puede atribuirse al diferente origen de las enzimas, ya que la lipasa utilizada por Sih era del laboratorio Amano y la utilizada por Rantakylä²⁴¹ y por nosotros procedía del laboratorio Novo-Nordisk.

Sin embargo, Palomer y cols.^{247,276} observaron también una modificación de la enantioselectividad de la lipasa de *Rh.miehei* por el isómero R(-) del Ketoprofeno.

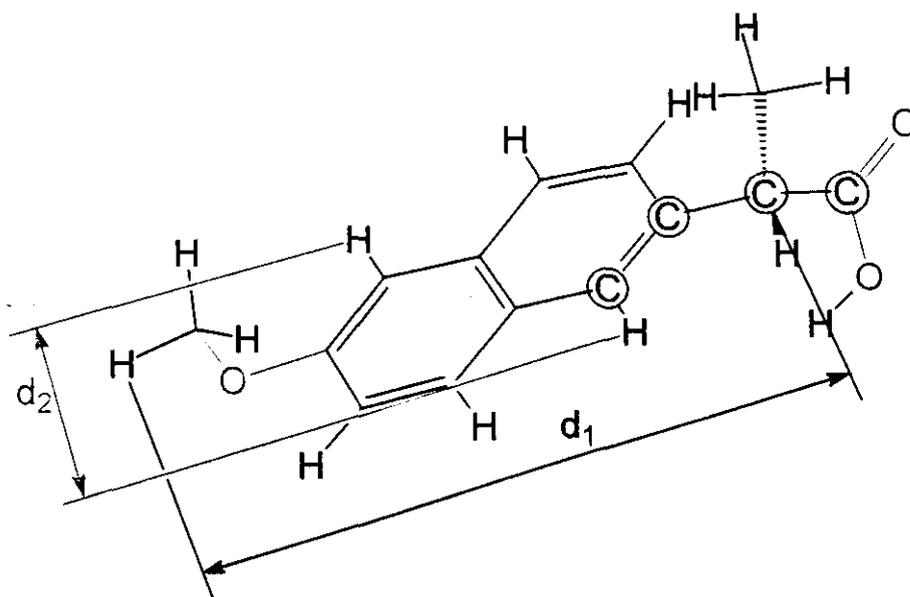
La enantioselectividad de la lipasa de *Rh.miehei* por el enantiómero S de los ácidos (R,S) 2-arilpropiónicos, excepto en el caso del Ketoprofeno, observada en la presente Tesis Doctoral condujo a la obtención del éster S y el ácido R, tras la reacción de síntesis enantioselectiva de dichos ácidos. Aunque el resultado obtenido fue opuesto al que se perseguía, la obtención directa del ácido S(+), este resultado supuso un importante avance en



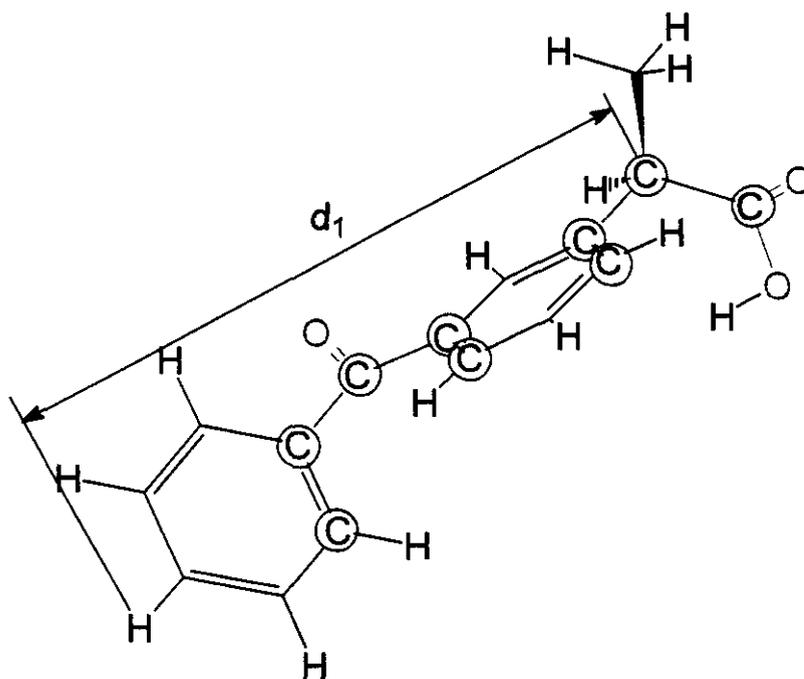
CONFORMERO	CONFIG.	E (kcal/mol)	angulo (°)	d1 (Å)	d2 (Å)
SFEN1	S	7.141	-55.8	5.09	4.35
RFEN1	R	7.141	+55.8	5.09	4.35



CONFORMERO	CONFIG.	E (kcal/mol)	angulo (°)	d1 (Å)	d2 (Å)	d3 (Å)
SIBU1	S	15.94	-55.8	8.41	4.324	3.83
RIBU1	R	15.94	+55.8	8.41	4.324	3.83



CONFORMERO	CONFIG.	E (kcal/mol)	angulo (°)	d1 (Å)	d2 (Å)
SNAP1	S	-4.01	-54.43	9.75	5.93
SNAP2	S	-4.01	-53.33	9.75	5.93
RNAP1	R	+0.46	+54.31	9.68	5.93
RNAP2	R	-3.27	+54.22	9.87	5.93



CONFORMERO	CONFIG.	E (kcal/mol)	angulo(°)	d1 (Å)	angulo (°)
SKETC01	S	10.58	-51.69	9.75	81.2
SKETC02	S	10.58	-51.69	9.75	-67.0
SKETC00	S	9.74	-56.38	9.79	-128.23
RKETC01	R	10.58	51.69	9.75	67.4
RKETC00	R	10.57	105.70	9.74	124.0
RKETC02	R	9.76	56.10	9.81	126.0

Dado que los cuatro sustratos son reconocidos por la lipasa de *Rh.miehei*, se puede suponer que el lugar de reconocimiento debe tener unas dimensiones tales que permitan la entrada del sustrato más voluminoso. Así pues, el tunel de reconocimiento del grupo arilo debe tener una profundidad de la menos 9,8 Å, puesto que es la longitud de los enantiómeros más largos (Naproxeno y Ketoprofeno) y una anchura y una altura como mínimo de 5,93 Å cada una de ellas para permitir la entrada del sustrato más voluminoso (Naproxeno). Las dimensiones del lugar de reconocimiento del grupo arilo, diseñadas en función de los estudios conformacionales de los ácidos (R,S) 2-arilpropiónicos se representan en la Figura 90 A.

Asimismo, en este tunel cabría perfectamente el ácido 2-metildecanoico, que es el sustrato de la lipasa de *Rh.miehei* más largo de todos los descritos en la bibliografía para dicha enzima y que tiene una longitud de 9,8 Å y una anchura de 5,56 Å. En la Figura 90B se representa el conformero de mínima energía de dicho ácido, dentro del lugar de reconocimiento de arilo diseñado en la Figura 90A en función de las dimensiones de los ácidos (R,S) 2-arilpropiónicos.

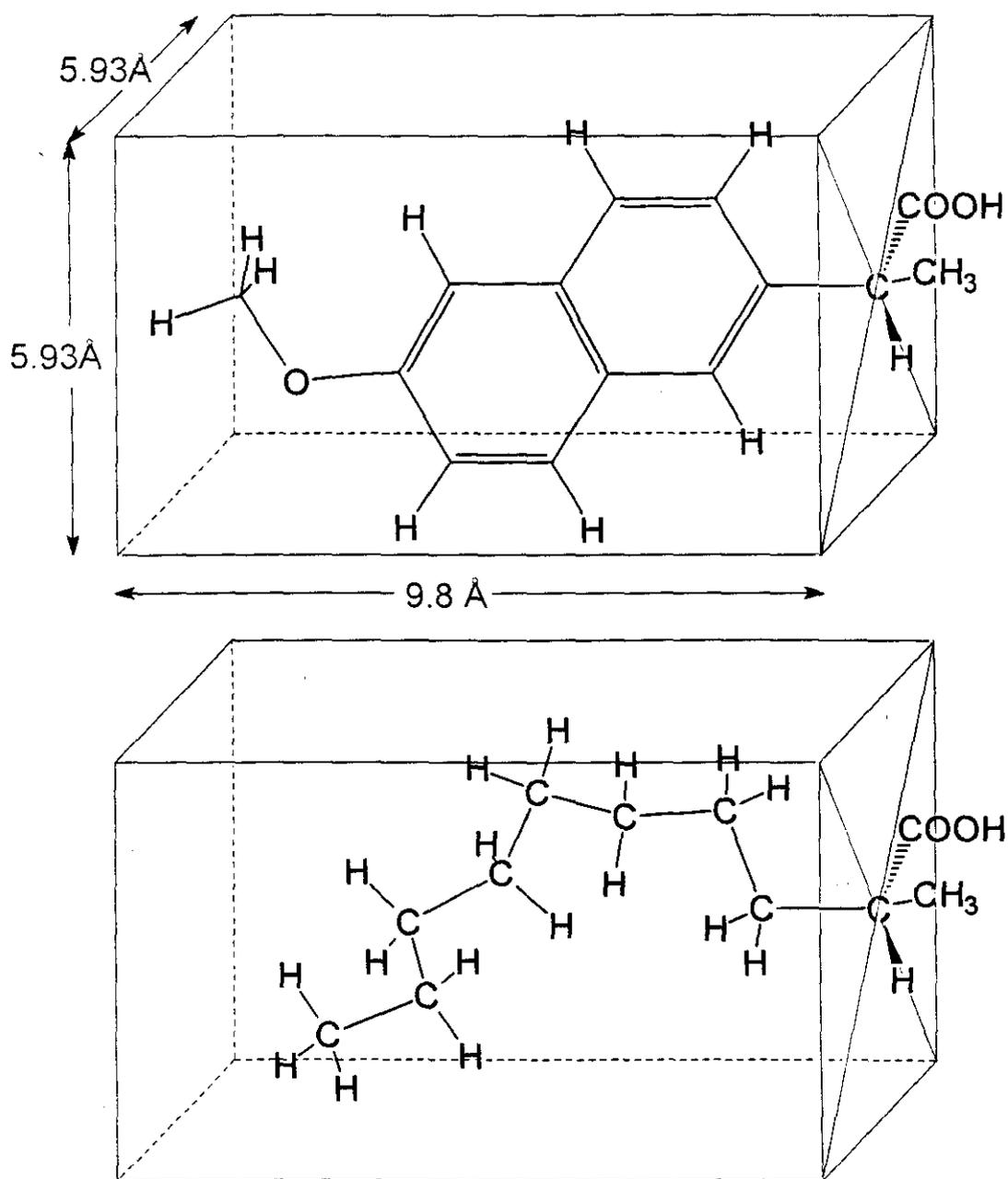


Figura 90: Dimensiones del lugar de reconocimiento del grupo arilo de la lipasa de *Rh.miehei*. En la Figura A se sitúa el Naproxeno y en la Figura B el ácido 2-metildecanoico.

La diferente enantioselectividad observada en esta Tesis Doctoral no es la primera vez que se describe para esta lipasa, como se comentó en el apartado IV.4.1. y al principio de esta sección.

Holmquist y cols.¹⁸⁹ describieron en 1993 el cambio de enantioselectividad del enantiómero S al R en las reacciones de hidrólisis del 2-metil-decanoato de 1-heptilo y del 2-metil-decanoato de bencilo, catalizadas por la lipasa de *Rh.miehei*. Estos autores atribuyen este cambio de enantioselectividad a la diferente interacción del alcohol con la tapadera de la lipasa, ya que la mutación del residuo Arg-86 de la tapadera a Glu87 provoca la alteración de la enantioselectividad de las reacciones de hidrólisis estudiadas.

Dado que en nuestro caso el sustrato quiral es el ácido y no el alcohol se procedió al estudio de las variaciones de energía producidas al girar determinados enlaces que se consideraron críticos en la molécula de R(-) Ketoprofeno y de S(+) Ketoprofeno para poder acoplarse al centro activo de la lipasa de *Rh.miehei*.

En la Figura 91 se indican los 3 giros realizados en la molécula de Ketoprofeno utilizando para ello la Dinámica Molecular.

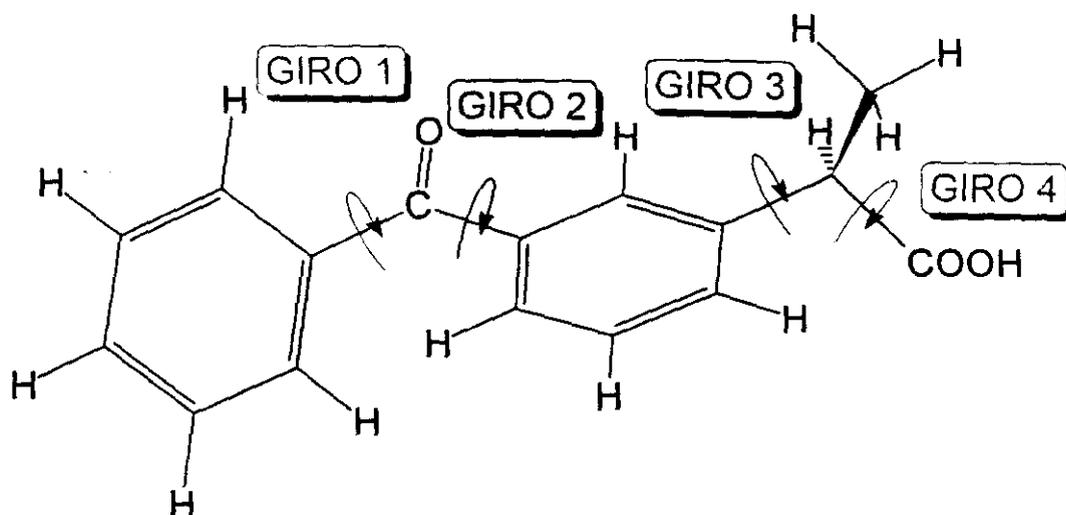


Figura 92: Giros realizados en la molécula del (R,S) Ketoprofeno

A continuación se indica la variación de energía producida al realizar cada uno de los giros indicados en la Figura 92 y el ángulo de giro de cada enlace.

GIRO 1		GIRO 2	
ángulo de giro (°)	ΔE (%)	ángulo de giro (°)	ΔE (%)
α_0	0	α_0	0
$\alpha_0 + 70^\circ$	336	$\alpha_0 + 70^\circ$	330
$\alpha_0 + 180^\circ$	0,8	$\alpha_0 + 180^\circ$	2,1
$\alpha_0 + 250^\circ$	340	$\alpha_0 + 250^\circ$	301
$\alpha_0 + 310^\circ$	4,5	$\alpha_0 + 320^\circ$	4,8
$\alpha_0 + 360^\circ$	0	$\alpha_0 + 360^\circ$	0

GIRO 3		GIRO 4	
ángulo de giro (°)	ΔE (%)	ángulo de giro (°)	ΔE (%)
α_0	0	α_0	0
$\alpha_0 + 120^\circ$	43	$\alpha_0 + 90^\circ$	- 0,3
$\alpha_0 + 180^\circ$	1,6	$\alpha_0 + 180^\circ$	- 0,6
$\alpha_0 + 240^\circ$	8,0	$\alpha_0 + 270^\circ$	5,7
$\alpha_0 + 310^\circ$	40,7	$\alpha_0 + 360^\circ$	0
$\alpha_0 + 360^\circ$	0		

De estos resultados se puede obtener las siguientes conclusiones:

a).- Del giro 4 se deduce que el grupo carboxilo tiene practicamente total libertad de giro para acoplarse al centro activo de la enzima.

b).- Del giro 3 se deduce que el enlace que une el centro estereogénico con el primer carbono aromático tiene cierta dificultad de giro, con dos máximos a ($\alpha_0 + 120^\circ$) y ($\alpha_0 + 310^\circ$) y dos mínimos a α_0 y ($\alpha_0 + 180^\circ$)

c).- De los giros 1 y 2 se deduce que los dos bencenos presentan gran dificultad de giro, por lo que dificilmente podrá alterarse su conformación para acoplarse al centro activo de la enzima.

De forma análoga se realizó el estudio de los giros de los enlaces de la molécula de Naproxeno. Se eligió esta molécula entre los ácidos 2-arilpropiónicos para los que la lipasa de *Rh.miehei* es S-enantioselectiva porque el anillo de naftaleno es el radical más rígido y por tanto el que menos alterará su conformación para acoplarse al centro activo de la lipasa de *Rh.miehei*. En la Figura 92 se indican los enlaces de la molécula de Naproxeno que se han rotado en este estudio

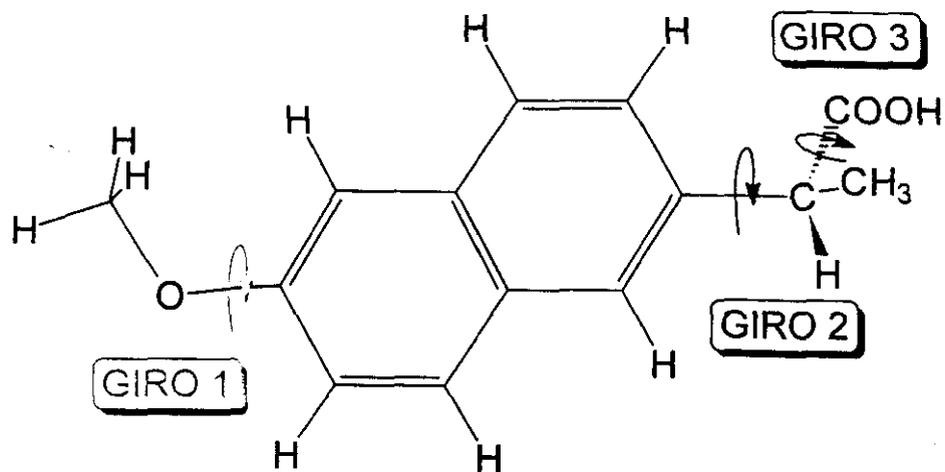


Figura 92: Giros realizados en la molécula de (R,S) Naproxeno

A continuación se indican los ángulos de giro realizados y la diferencia de energía producida tras cada giro

GIRO 1		GIRO 2	
ángulo de giro (°)	ΔE (%)	ángulo de giro (°)	ΔE (%)
α_0	0	α_0	0
$\alpha_0 + 60^\circ$	11	$\alpha_0 + 60^\circ$	7,3
$\alpha_0 + 120^\circ$	9,4	$\alpha_0 + 120^\circ$	1,1
$\alpha_0 + 180^\circ$	4,5	$\alpha_0 + 180^\circ$	2,2
$\alpha_0 + 250^\circ$	12	$\alpha_0 + 240^\circ$	7,4
$\alpha_0 + 300^\circ$	6,1	$\alpha_0 + 300^\circ$	0,1
$\alpha_0 + 360^\circ$	0	$\alpha_0 + 360^\circ$	0

GIRO 3

ángulo de giro (°)	ΔE (%) ⁻
α_0	0
$\alpha_0 + 60^\circ$	- 2,8
$\alpha_0 + 120^\circ$	11,4
$\alpha_0 + 180^\circ$	4,3
$\alpha_0 + 240^\circ$	0,9
$\alpha_0 + 300^\circ$	5,7
$\alpha_0 + 360^\circ$	0

De estos resultados se puede deducir que las barreras energéticas de los giros de la molécula de S(+) Naproxeno son pequeñas, por lo que esta molécula podrá acomodarse con facilidad en el centro activo de la lipasa de *Rh.miehei*.

Resultados análogos de diferencia de energía (ΔE) se obtuvieron para los giros del ácido (R,S) 2-fenilpropiónico y del (R,S) Ibuprofeno.

A continuación se superpusieron los enantiómeros S(+) del ácido 2-fenilpropiónico, del Ibuprofeno y del Naproxeno por el carbono estereogénico y por el primer anillo aromático de estas moléculas.

En las Figuras 93 A y B se representan los enantiómeros S(+) Ibuprofeno y el ácido S(+) 2-fenilpropiónico superpuestos y analizados desde distinto ángulo. En la Figura A se analiza su disposición en un plano y en la Figura B se representa su disposición girando dicho plano un ángulo de 90°.

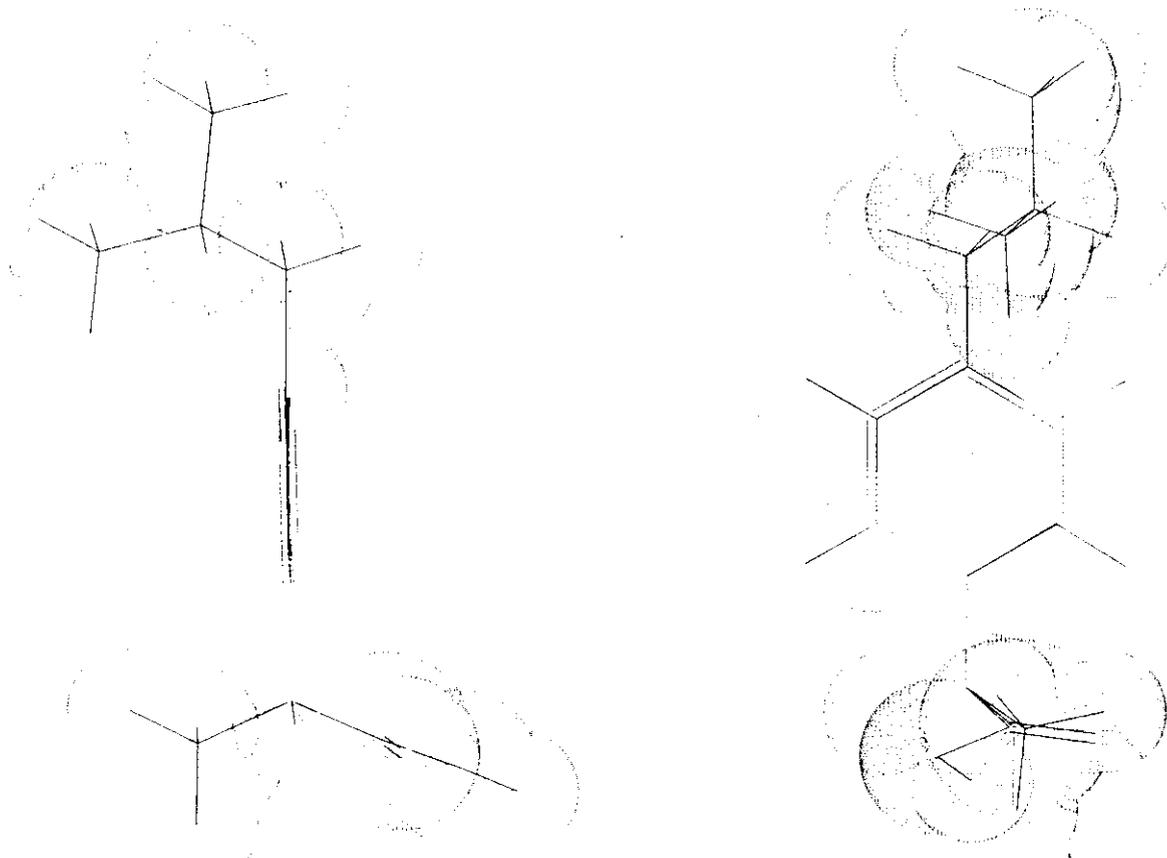


Figura 93: Enantiómeros S(+)
Ibuprofeno y ácido S(+)
2-fenilpropiónico superpuestos.

Como se observa en la Figura 93 los dos enantiómeros analizados se superponen totalmente. Los restos carboxilo, metilo y los hidrógenos de ambas moléculas se disponen en la misma zona espacial y los anillos aromáticos se solapan por completo.

A continuación se superpusieron los enantiómeros S(+)
Ibuprofeno y S(+)
Naproxeno, también a través del centro estereogénico y del primer anillo aromático de cada molécula, tal y como se representa en la Figura 94.

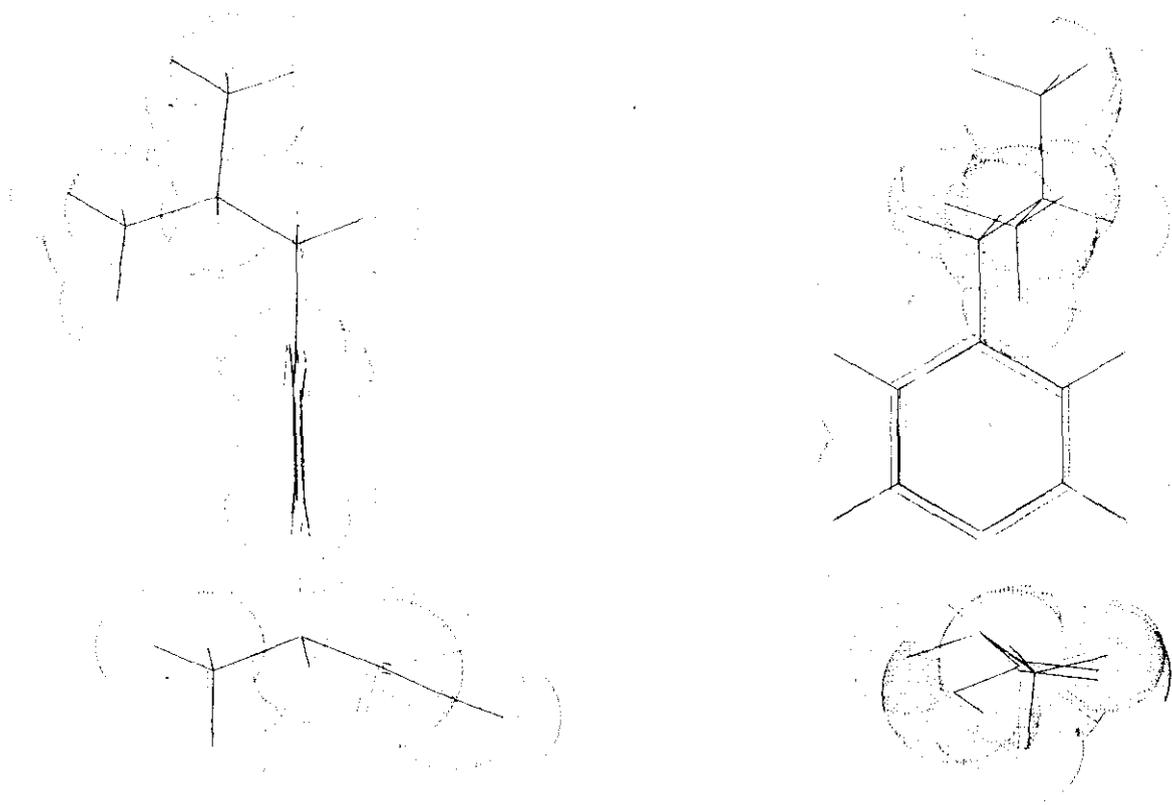


Figura 94: Enantiómeros S(+) Ibuprofeno y S(+) Naproxeno superpuestos.

En esta Figura se observa también que las dos moléculas se superponen totalmente, disponiéndose sus restos carboxilo, metilo e hidrógeno en la misma zona y solapándose el resto fenilo del S(+) Ibuprofeno con el primer anillo aromático del naftaleno de la molécula de S(+) Naproxeno.

Asimismo, se observa que las zonas finales de las dos moléculas presenta unas dimensiones muy similares. Esta zona se sitúa en el lugar de reconocimiento del grupo arilo en la lipasa de *Rh.miehei*, de lo que se deduce que aunque el Naproxeno es más voluminoso que el Ibuprofeno, su disposición en el centro activo de la enzima es muy similar.

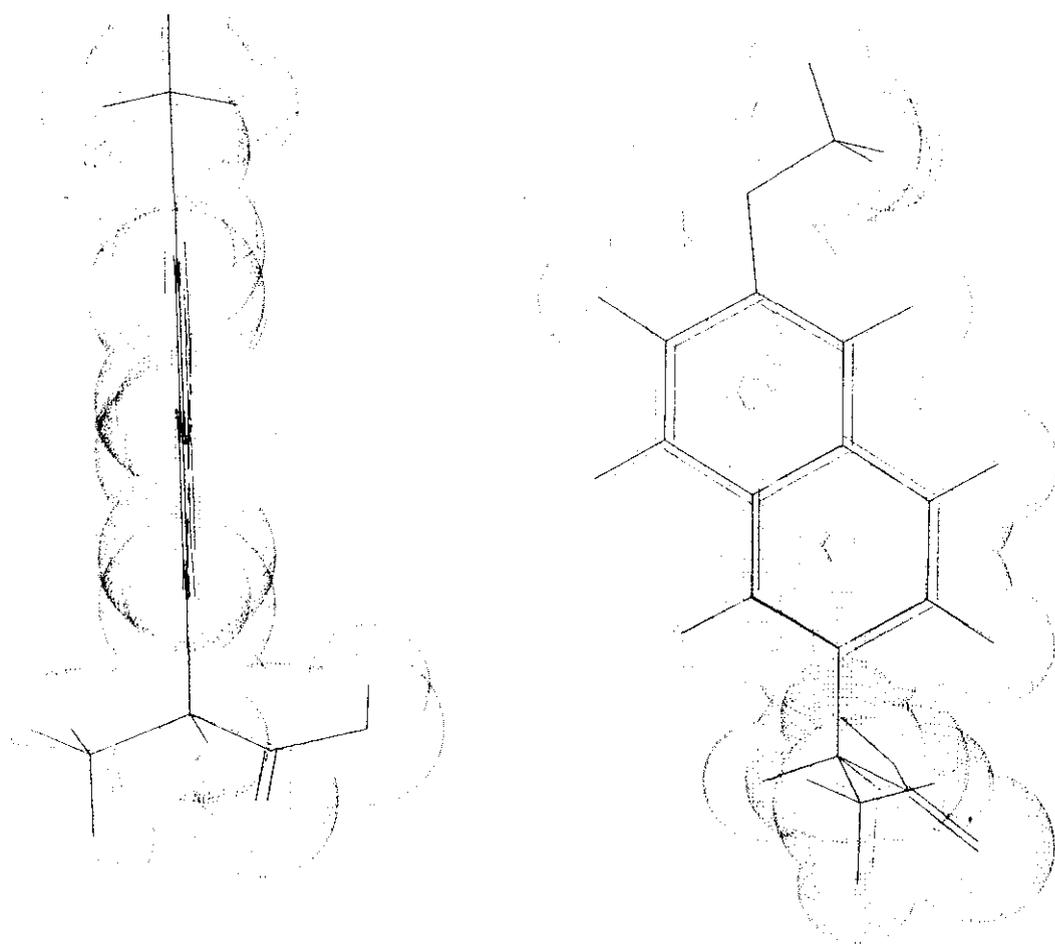


Figura 95: Enantiómeros S(+) Naproxeno y R(-) Ketoprofeno superpuestos.

A continuación se analizaron las características estructurales de los enantiómeros R y S de Ketoprofeno, con el fin de determinar la causa del cambio de enantioselectividad de la lipasa de *Rh.miehei* cuando actúa sobre el (R,S) Ketoprofeno. Para ello se superpusieron los dos enantiómeros de Ketoprofeno sobre el S(+) Naproxeno, que es el enantiómero S más voluminoso.

En la Figura 95 A se observa que los grupos metilo e hidrógeno de los enantiómeros R(-)Ketoprofeno y S(+)Naproxeno se colocan hacia lados opuestos, mientras que los grupos carboxilo de ambos se colocan en la misma zona, tal y como se observa en la Figura A. Asimismo se puede comprobar que la zona aromática de los dos enantiómeros presenta una disposición muy similar, ya que el resto benzoilo del R(-) Ketoprofeno está girado de forma que queda muy próximo al anillo de naftaleno del S(+) Naproxeno.

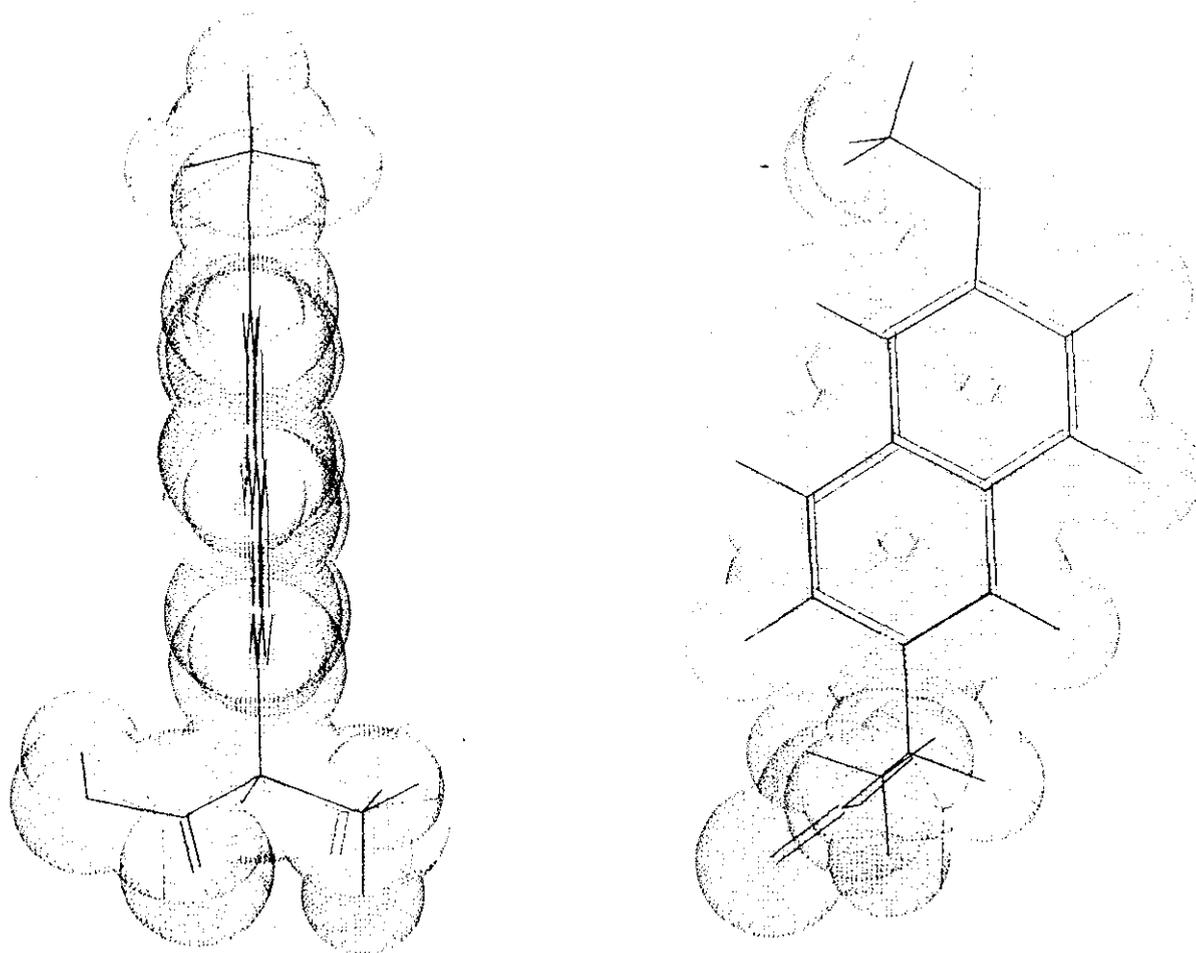


Figura 96: Enantiómeros S(+)-Naproxeno y S(+)-Ketoprofeno superpuestos.

En esta Figura se superpuso el S(+)-Naproxeno sobre el mismo enantiómero de Ketoprofeno. En este caso se observa que la estructura de los dos enantiómeros es muy diferente, ya que los restos carboxilo, metilo e hidrógeno de ambos se disponen en zonas opuestas. Sin embargo el factor más llamativo es la disposición del resto benzoilo del S(+)-Ketoprofeno, que está muy alejado del naftaleno del S(+)-Naproxeno, a diferencia de lo que se observó al superponer el enantiómero R(-)-Ketoprofeno. Como se comprobó en la página 295, el giro 1 de la molécula de Ketoprofeno está muy impedido ya que requiere mucha energía. Como consecuencia de la rigidez de ese enlace el enantiómero S(+)-Ketoprofeno no puede entrar en el "túnel" de reconocimiento del grupo arilo en la lipasa de *Rh. miehei* y por eso esta lipasa varía su enatiopreferencia en el caso del Ketoprofeno.

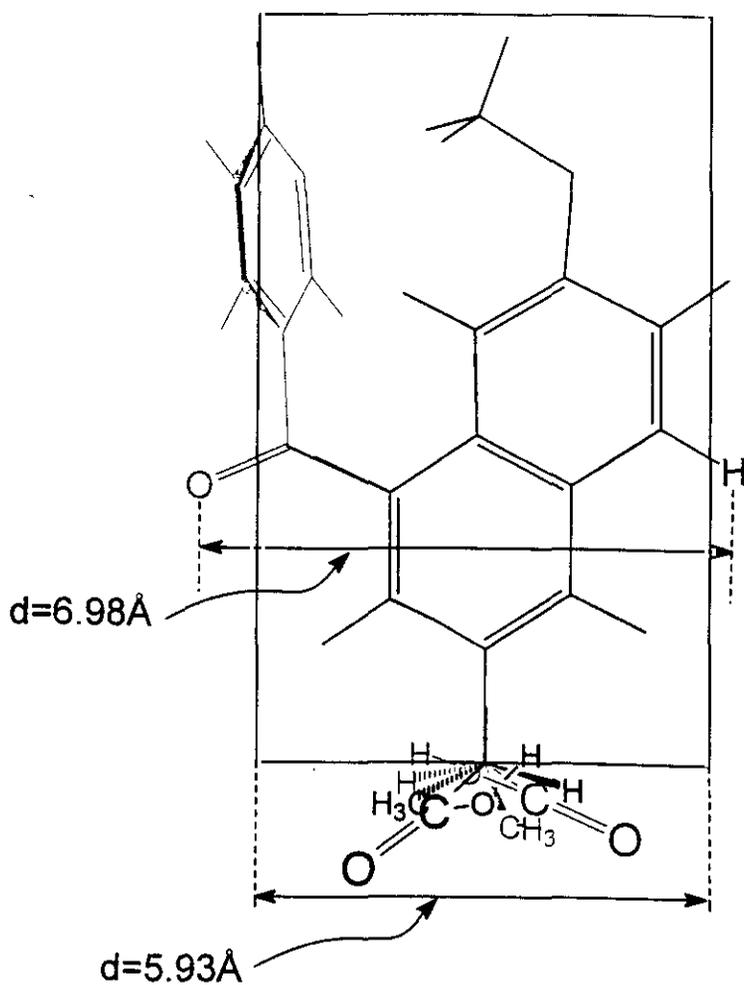


Figura 97: Dimensiones de los enantiómeros S(+)-Naproxeno y S(+)-Ketoprofeno superpuestos.

Para comprobar las dimensiones del enantiómero S(+) Ketoprofeno se midió la anchura de la Figura 96 en la que se superpusieron los enantiómeros S(+)Naproxeno y S(+)Ketoprofeno. Como se observa en la Figura 97 la anchura de la zona aromática del S(+) Ketoprofeno es muy superior (6,98 Å) a las dimensiones calculadas en la Figura 90 para la zona de reconocimiento de los grupos arilo en la estrucutra de la lipasa de *Rh.miehei*, que se calculó fue de 5,93 Å. Por todo ello se puede concluir que el factor determinante del cambio de enantiopreferencia de la lipasa de *Rh.miehei* respecto del (R,S)Ketoprofeno fue la gran distancia de la zona arilo del enantiómero S(+)Ketoprofeno debido a la disposición de su resto bencilo y a la imposibilidad de giro de su enlace.

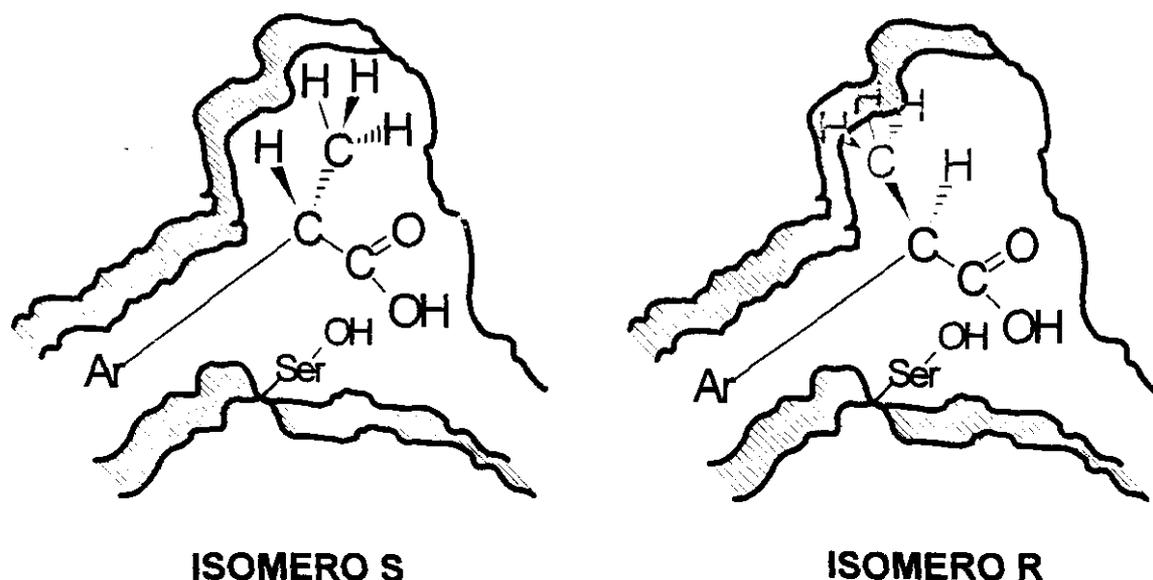


Figura 98: Disposición de los enantiómeros R y S de los ácidos (R,S) 2-arylpropiónicos en el centro activo de la lipasa de *Rh.miehei*.

Así pues se puede concluir a nivel cualitativo que:

a).- los sustratos flexibles (R,S) Ibuprofeno; ácido (R,S) 2-fenilpropiónico y (R,S) Naproxeno se acomodan con facilidad al tunel de reconocimiento del grupo arilo de la lipasa de *Rh.miehei*.

b).- la enantioselectividad observada para los ácidos (R,S) 2-arylpropiónicos indicados en el apartado anterior (enantiómero S > enantiómero R) viene controlada por los subsitios de reconocimiento del hidrógeno y del metilo, ya que estos subsitios del centro activo de la enzima reconocen mejor a estos grupos en la configuración S. Como se representa en la Figura 98 el isómero S se acopla perfectamente, mientras que el grupo metilo del isómero R tiene mayor impedimento para acoplarse y el hidrógeno queda totalmente suelto en el centro activa.

c).- Por el contrario, en el caso de la molécula rígida, (R,S) Ketoprofeno, es la geometría del grupo arilo la que determina qué enantiómero puede unirse, siendo para este compuesto el isómero R(-). Ésto explicaría cualitativamente el cambio de enantioselectividad observada.

IV.6.3.- ACTIVIDAD DE LA LIPASA DE *Rh.miehei* SEMIPURIFICADA E INMOVILIZADA.

Tras analizar las variables de operación y estructurales que participan en la reacción de esterificación enantioselectiva de ácidos (R,S) 2-arilpropiónicos, catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* cruda (Lipozyme[®] 10000L) e inmovilizada por adsorción sobre una resina de intercambio aniónico (Lipozyme[®] IM20) se analizó la actividad de la lipasa de *Rh.miehei* semipurificada por diálisis y por precipitación con sulfato amónico en esa misma reacción; así como la actividad de la lipasa cruda y semipurificada inmovilizadas por enlace covalente con sílice.

Para este estudio se llevó a cabo la reacción estándar de esterificación (síntesis del éster butílico de (R,S) Ibuprofeno en ciclohexano a 37 °C), catalizada por los diferentes derivados semipurificados y/o inmovilizados de la lipasa de *Rh.miehei*.

Dado que el contenido protéico de cada enzima es diferente y con el fin de comparar el rendimiento obtenido en cada reacción, se expresó el rendimiento en milimoles de éster formado por miligramo de proteína. La determinación de la cantidad de proteínas se hizo por el método del biuret en unos casos y por el método de Bradford en otros, por lo que se aplicó un factor de conversión ($f = 8,5$) para unificar criterios y expresar todos los resultados según el método de Bradford.

Los resultados obtenidos en el transcurso de cada reacción se ajustaron a cinéticas de primer orden ($y = A (1 - e^{-kt})$) y se calculó el valor de la velocidad inicial (V_0) ($V_0 = A k$) con el programa EXFIT, del paquete estadístico SIMFIT versión 4.0²⁵⁴.

Asimismo, se analizó la enantioselectividad de cada reacción. El parámetro utilizado para este estudio fue el factor de enantioselectividad (FE), definido en la presente Memoria (ver IV.6.1.a.3.) para determinar la enantioselectividad en un momento determinado de la reacción y que permitió comparar los resultados obtenidos con cada enzima.

IV.6.3.a.- Estudio de la actividad de la lipasa de *Rh.miehei* SEMIPURIFICADA

Como se indicó anteriormente, la lipasa de *Rh.miehei* (Lipozyme[®] 10000L) fue semipurificada siguiendo dos metodologías:

- a).- diálisis y centrifugación
- b).- precipitación con sulfato amónico

En las Figuras 99 se representan las cinéticas de primer orden del rendimiento obtenido en cada reacción a lo largo del tiempo. A partir de cada una de estas curvas se determinó el valor de velocidad inicial (V_0), que permitió comparar la actividad de cada derivado semipurificado.

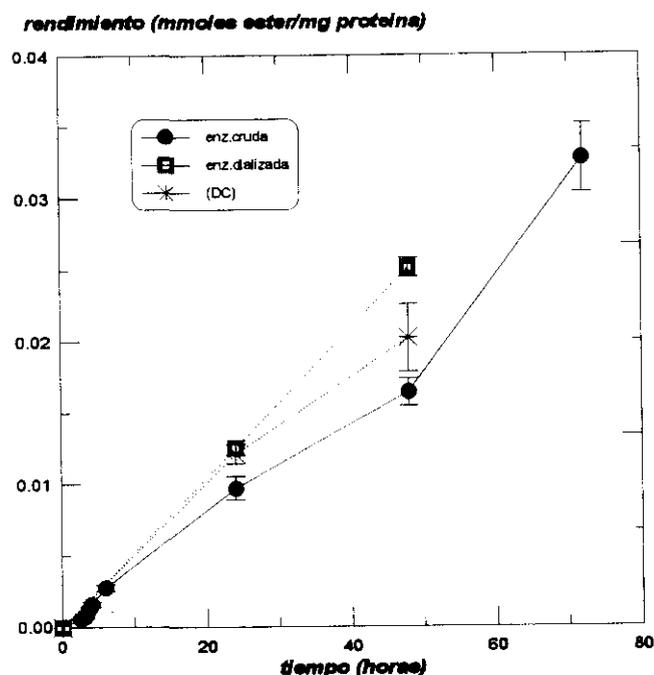


Figura 99: Evolución de la reacción de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* cruda semipurificada por diálisis (Dial) y posterior centrifugación (DC).

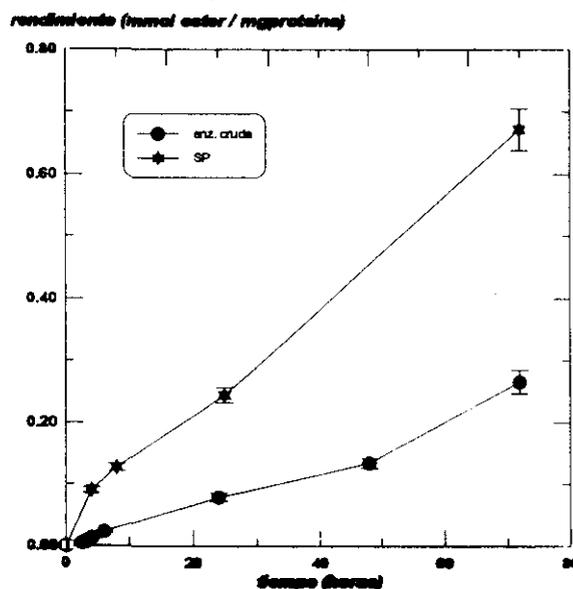


Figura 100: Evolución de la reacción de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno, catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* cruda y semipurificada por precipitación con sulfato amónico.

En la Tabla 67 se recogen los valores de velocidad inicial (V_0), factor de purificación (F_{purif}), exceso enantiomérico (ee) y factor de enantioselectividad (FE) obtenidos en la reacción estándar de síntesis de ésteres catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* cruda y semipurificadas.

Tabla 67: Valores de velocidad inicial (V_0), exceso enantiomérico (ee) y factor de enantioselectividad (FE) obtenidos en la reacción de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno, catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* cruda y semipurificada.

ENZIMA	V_0 (mmoles/mg prot h)	F_{purif}	ee (%)(72h)	FE (72h)
CRUDA	$3,6 \cdot 10^{-3} (*)$		68 ± 3	0,32
Dial	$6,6 \cdot 10^{-3} (*)$	1,8	$12,3 \pm 0,6$	0,75
DC	$3,4 \cdot 10^{-3} (*)$	0,9	$5,1 \pm 0,2$	0,49
50 %	$11,9 \cdot 10^{-3}$	3,3	$15,5 \pm 0,8$	0,89
60 %	$5,5 \cdot 10^{-3}$	1,5	$9,2 \pm 0,4$	0,63
70 %	$2,8 \cdot 10^{-3}$	0,7	$5,1 \pm 0,2$	0,70
80 %	$3,9 \cdot 10^{-3}$	1,1	$8,0 \pm 0,4$	0,61

(*) se aplicó el factor de corrección ($f = 8,5 \pm 0,9$) para expresar la cantidad de proteína según el método de Bradford.

A la vista de los resultados recogidos en la Tabla 67 y en las Figuras 99 y 100 se observa que la lipasa semipurificada por diálisis resultó ser más activa que la lipasa cruda de *Rh.miehei*; mientras que tras la posterior centrifugación, la actividad sintetasa del derivado obtenido fue semejante a la de la lipasa cruda.

Analizando los resultados obtenidos con la lipasa semipurificada por precipitación con diferentes porcentajes de saturación de sulfato amónico se observa que el factor de purificación (definido como la relación de las actividades de la lipasa cruda con cada uno de los derivados semipurificados) presenta un valor dos veces superior para la enzima semipurificada con un 50% de saturación, siendo semejante al de la enzima cruda el de los biocatalizadores obtenidos por precipitación con un 60, 70 y 80 % de saturación con sulfato amónico.

En cuanto a la enantioselectividad, la lipasa de *Rh.miehei* tras los diferentes procesos de semipurificación mantiene su enantiopreferencia hacia el isómero S(+) de Ibuprofeno.

IV.6.3.b.- Estudio de la actividad de la lipasa de *Rh.miehei* INMOVILIZADA.

Una vez comprobado que la lipasa semipurificada por precipitación con un 50% de saturación de sulfato amónico era la más activa en la reacción de síntesis de ésteres se procedió a su inmovilización por enlace covalente sobre un soporte de sílice. A continuación, se estudió la actividad del derivado obtenido (SIL-SP) en la misma reacción estándar de síntesis y se comparó con la actividad del derivado inmovilizado sobre sílice de la lipasa cruda de *Rh.miehei* (Lipozyme® 10000L). En la Tabla 68 se recogen los resultados obtenidos, cuya representación gráfica a lo largo del tiempo se muestra en la Figura 101

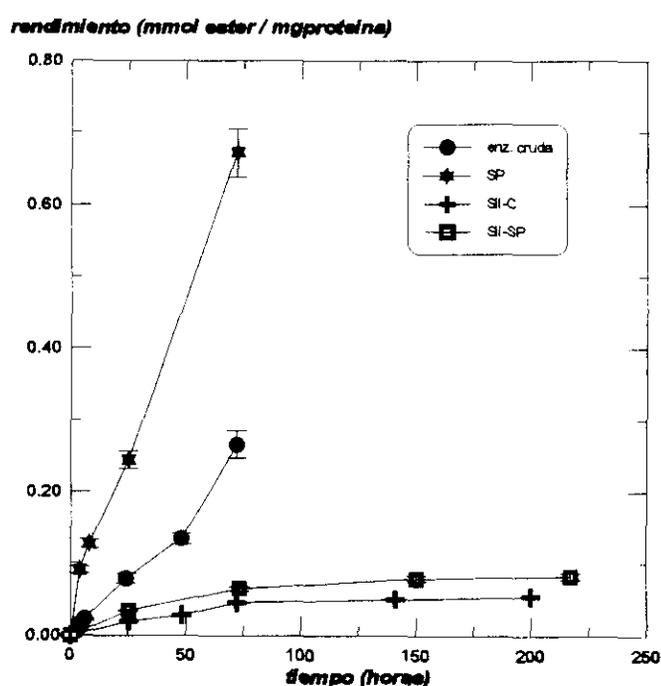


Figura 101: Evolución de la reacción de síntesis del éster butílico de (R,S) Ibuprofeno catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* cruda y semipurificada por precipitación, inmovilizada ambas por enlace covalente con sílice.

Tabla 68: Valores de velocidad inicial (V_0), exceso enantiomérico (ee) y factor de enantioselectividad (FE) obtenidos en la reacción de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno, catalizada por la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada sobre sílice por enlace covalente.

ENZIMA	V_0 (mmoles ester/mgprot h)	ee (%)(72h)	FE
CRUDA	$3,6 \cdot 10^{-3} (*)$	68 ± 3	0,32
SP	$11,9 \cdot 10^{-3}$	$15,5 \pm 0,8$	0,89
SIL-C	$0,95 \cdot 10^{-3} (*)$	$3,5 \pm 0,1$	0,70
SIL-SP	$1,7 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \pm 0,05$	0,36

(*) se aplicó el factor de corrección ($f = 8,5 \pm 0,9$) para expresar la cantidad de proteína según el método de Bradford.

Los dos derivados obtenidos tras la inmovilización por enlace covalente con sílice de la lipasa de *Rh.miehei* cruda y semipurificada fueron menos activos que las correspondientes enzimas no inmovilizadas. Por lo que se llegó a la conclusión de que los derivados de la lipasa de *Rh.miehei* inmovilizados por enlace covalente no son adecuados como biocatalizadores de la reacción de síntesis del éster butílico de Ibuprofeno.

A la vista de todos estos resultados se puede concluir que para las reacciones de síntesis de ésteres de los ácidos (R,S) 2-aryl-propiónicos, los derivados de la lipasa de *Rh.miehei* más adecuados son: la misma lipasa cruda, el derivado inmovilizado comercial (Lipozyme® IM20) y la lipasa semipurificada por precipitación con un 50% de saturación de sulfato amónico. Este último derivado resultó ser, una vez más, el derivado de mayor actividad, como ya se observó en las diversas reacciones estudiadas.

CONCLUSIONES

Las **conclusiones obtenidas** tras el desarrollo de la presente Tesis Doctoral son las siguientes:

1).- Se han puesto a punto diversas metodologías de caracterización de la lipasa de *Rh.miehei*, basadas en la determinación de su concentración de proteínas, su actividad esterásica y su actividad lipásica, que permiten la caracterización de dicha enzima de forma sencilla, eficaz y rápida.

2).- Tras la semipurificación de la lipasa de *Rh.miehei* por diálisis y sucesivas centrifugaciones a 5000 r.p.m., se logra un cierto grado de purificación de esta enzima. Sin embargo, aunque su actividad esterásica específica se mantiene inalterada, su actividad lipásica específica disminuye notablemente.

3).- Mediante la precipitación de la lipasa cruda de *Rh.miehei* con un 50% de saturación de sulfato amónico se obtiene una enzima más pura que por los otros métodos ensayados. Esta enzima semipurificada presenta una actividad enzimática (lipásica y esterásica) superior a la de la lipasa cruda. La sencillez del método de purificación, su bajo coste y la elevada actividad enzimática observada hacen este método muy aconsejable desde el punto de vista tecnológico.

4).- Se ha inmovilizado la lipasa de *Rh.miehei* por unión covalente sobre sílice (SIL-C), obteniendo un derivado de elevada actividad lipásica y esterásica. Asimismo, se ha incrementado notablemente la estabilidad térmica de esta enzima, lo que hace que este derivado sea muy interesante para posibles aplicaciones industriales.

5).- El nuevo derivado inmovilizado de la lipasa de *Rh.miehei* es más activo y estable en medio acuoso que el derivado comercial (Lipozyme® IM20) obtenido por adsorción iónica sobre una resina de intercambio aniónico.

6).- Tras la inmovilización, también por unión covalente con sílice, de la lipasa de *Rh.miehei* semipurificada por precipitación con sulfato amónico, se obtuvo un derivado (SIL-SP) más termoestable que el derivado de la lipasa cruda (SIL-C). Así pues la combinación de la semipurificación por tratamiento con un 50 % de saturación de sulfato amónico y la inmovilización covalente sobre sílice constituyen una excelente metodología que conduce a la obtención de derivados activos y estables de la lipasa de *Rh.miehei*.

7).- Al contrario de lo indicado por diversos autores, la lipasa de *Rh.miehei* del laboratorio Novo-Nordisk presenta una marcada enantioselectividad por el isómero R(-) de los ácidos (R,S) 2-arylpropiónicos, excepto en el caso del Ketoprofeno. Con el fin de obtener el isómero S(+) activo se planteó la estrategia de hidrólisis enantioselectiva de los correspondientes ésteres butílicos pero debido a numerosos inconvenientes técnicos, que dificultaban la formación correcta de una interfase, elemento fundamental para el desarrollo de la actividad de las lipasas en medio acuoso, se varió de estrategia.

8).- La estrategia alternativa para la obtención enantioselectiva del isómero S(+) de los ácidos (R,S) 2-arylpropiónicos se basó en la síntesis de los correspondientes ésteres. Debido a la enantiopreferencia de la lipasa de *Rh.miehei* por el isómero S(+), se obtuvo en todos los casos, excepto con el Ketoprofeno, el éster S y el ácido R; pero esta mezcla se puede separar fácilmente por extracción.

9).- Se hizo un estudio de la influencia de las variables experimental en la actividad en medio orgánico de la lipasa de *Rh.miehei* cruda e inmovilizada por adsorción, del cual se dedujo que para la lipasa cruda la cantidad de enzima y el tiempo de reacción son las variables más influyentes, mientras que para la lipasa inmovilizada (Lipozyme® IM20) son la cantidad de agua añadida al medio y la cantidad de biocatalizador. A continuación se realizó un estudio detallado de la influencia de la cantidad de biocatalizador, del tiempo de reacción, de la temperatura y de la cantidad de agua del medio en la actividad de la lipasa de *Rh.miehei* tanto cruda como inmovilizada (IM20).

10).- Por primera vez se realizó una isoterma de la lipasa cruda de *Rh.miehei*, ya que debido a su elevado contenido en azúcares el proceso de liofilización y desecación es muy complicado.

Tras la rehidratación de la lipasa cruda de *Rh.miehei*, esta enzima no recuperó su actividad debido a las graves alteraciones sufridas durante el proceso de desecación. Por el contrario, la actividad de la lipasa inmovilizada (IM20) aumentó considerablemente tras su rehidratación. Asimismo se comprobó que el derivado inmovilizado alcanzó su máxima actividad a valores de actividad de agua (a_w) de 0,3, punto de corte de sus correspondientes isothermas de adsorción realizadas en aire y en ciclohexano.

11).- Del estudio de la influencia de la relación molar de sustratos (ácido y alcohol) en la actividad de la lipasa de *Rh.miehei* se dedujo que el exceso de alcohol provoca la inhibición de la lipasa cruda e inmovilizada de forma similar. Sin embargo, la influencia del exceso de ácido es diferente para cada enzima, ya que inhibe la actividad de la lipasa inmovilizada y por el contrario, provoca un importante aumento tanto de la actividad como de la enantioselectividad de la lipasa cruda de *Rh.miehei*.

12).- Del estudio de la influencia de diferentes disolventes orgánicos en la actividad de la lipasa de *Rh.miehei* se dedujo que el disolvente más apropiado es el ciclohexano ($\log P = 3,2$)

13).- Los mejores resultados de la reacción de esterificación catalizada por la lipasa de *Rh.miehei*, cruda e inmovilizada, se obtuvieron con alcoholes primarios de cadena lineal y con más de cuatro átomos de carbono, mientras que con los alcoholes secundarios la lipasa inmovilizada es inactiva y la lipasa cruda presenta una actividad muy pobre.

14).- Tanto la enzima cruda de *Rh.miehei* como la inmovilizada por adsorción mostraron preferencia por el isómero S(+) de los ácidos (R,S) 2-arylpropiónicos estudiados, excepto en el caso del (R,S) Ketoprofeno, donde el isómero preferido resultó ser el R(-).

Con el fin de poder explicar estos resultados se llevaron a cabo diversos estudios de Dinámica y Mecánica Molecular que indican la posibilidad de que el factor clave para el

Conclusiones

reconocimiento de los sustratos sea la correcta disposición del resto aromático de la molécula dentro de un "túnel" en la estructura de la lipasa de *Rh.miehei*.

Para los isómeros S(+) de los ácidos analizados la ubicación del resto aromático y de las zonas de reconocimiento del metilo e hidrógeno del centro estereogénico son los adecuados. No obstante, los isómeros R(-) también son reconocidos por la lipasa de *Rh.miehei*, aunque peor, por lo que esta enzima no puede calificarse como enantioespecífica.

Para el caso especial del (R,S) Ketoprofeno, el isómero R(-) es el preferido puesto que, aunque las zonas de reconocimiento de metilo e hidrógeno están alterados, la enorme dificultad de giro del resto benzoilo de la molécula hace que la disposición que entra de forma correcta en el "túnel" aromático sea precisamente la del enantiómero R(-), ya que la conformación del isómero S(+) es más voluminosa y no puede entrar.

BIBLIOGRAFIA

VI.- BIBLIOGRAFIA

- 1 Fischer E. - *Ber.Deutsch.Chem.Ges.* 24; 2683 (1894)
- 2 Koshland D. y Boyer P.- *Ann.Rev.Biochem.* 37; 374 (1968)
- 3 (a) Mosbach K.- *Method.Enzymol.* 44 (1976)
(b) Mosbach K.- *Method.Enzymol.* 135-137 (1987)
(c) Chibata I.- "*Immobilized Enzymes*". Ed.Wiley (New York, EEUU) (1978)
- 4 (a) Gerhartz W.- "*Enzymes in Industry*". Ed.VCH (Berlin,Alemania) (1990)
(b) Wu R. y Grossman L.- *Method.Enzymol.* 153-155 (1987)
(c) Goeddel D.V.- *Method.Enzymol.* 185; 185 (1990)
- 5 Carrea G.- *Trends Biotechnol.* 2; 102 (1984)
- 6 (a) Antonini E.; Carrea G.; Cremones P.- *Enz.Microb.Technol.* 3; 291 (1981)
(b) Lilly M.D.- *J.Chem.Technol.Biotechnol.* 32; 162 (1982)
(c) Martinek K.; Levashov A.V.; Khmel'nitsky Y.L.; Klyachko N.L. y Berezin I.V.- *Science* 218; 889 (1982)
- 7 Rawichandram V. y Subramanian E.- *Int.J Peptide Prot. Res.*, 18, 121 (1981)
- 8 Desnuelle P.- "*The Enzymes*" 3, (3ª ed). Eds. Academic Press INC.P.D. (New York, EEUU) 575 (1972)
- 9 Florkin M. y Stotz E.H.- "*Report of the Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry*". Eds. Elsevier Science Publishers (Amsterdam, Holanda) (1964).
- 10 Jensen R.G.- *Lipids* 18(9), 650 (1983).
- 11 Macrae A.R. y Hammond R.C.- *Biotechnol.Genetic Eng.*, 3, 193 (1985).
- 12 Sugihara A.; Shimada Y. y Tominaga Y.- *Appl.Microbiol.Biotechnol* 35, 738 (1991).
- 13 Zaks A. y Klivanov A.M.- *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 82, 3192 (1985).
- 14 (a) Gotor V.; Brieva R. y Rebolledo F.- *J.Chem.Soc.Chem.Commun.* 957 (1988).
(b) García M.J.; Rebolledo F. y Gotor V.- *Tetrahedron Asymm.*3(12), 1519 (1992).
- 15 Frykman H.; Ohmer N.; Norin T. y Hult K.- *Tetrahedron Lett.* 34(8), 1367 (1993).
- 16 Sarda L. y Desnuelle P.- *Biochim.Biophys.Acta.* 30, 513 (1958).

Bibliografía

- 17 Wills E.D.- *Advan.Lipids Res.* 3, 197 (1965).
- 18 Desnuelle P.- "*Molecular and cellular basis of digestion*". Ed. Elsevier Science Publishers (Amsterdam, Holanda) (1986)
- 19 Marchis-Mouren G.- *Bull.Soc.Chim.Biol.* 47, 2207 (1965).
- 20 Deuel H.J.- "*The Lipids*" 2. Eds. Wiley-Interscience (New York, EEUU) (1955)
- 21 Bier D.M. y Havel R.J.- *J.Lipids Res.* 11, 565 (1970).
- 22 Downey W.K. y Andrews P.- *Biochemistry J.* 112, 559 (1969).
- 23 Hassanien F.R. y Mukherjee K.D.- *J.Am.Oil Chem.Soc.*, 63, 893 (1986)
- 24 Caillat J.M. y Drapon R.- *Bull.Soc.Chim.Biol.* 52, 59 (1970).
- 25 Savaray D.; Flanzly J.; Constantin M.J. Desnuelle P.- *Bull.Soc.Chim.Biol.* 39, 413 (1957).
- 26 Sullivan B. y Howe M.A.- *J.Am.Chem.Soc.* 55, 320 (1933).
- 27 Moran T.- *Food Manuf.* 27, 73 (1952).
- 28 Alford J.A.; Pierce D.A. y Suggu F.G.- *J.Lipids Res.* 5, 390 (1964).
- 29 Benzonana G. y Esposito S.- *Biochim.Biophys.Acta* 231, 15 (1971).
- 30 Shimada Y.; Sugihara A.; Tominaga Y y Iizumi T.- *J.Biochem.* 107, 703 (1990)
- 31 Shimada Y; Iwai M. y Tsujisaka J.- *J.Biochem.* 89, 937 (1981)
- 32 van Oort M.G.; de Veer A.M.; Dijkman R.; Tjeenk M.L.; Verheij H.M.; de Haas G.H.; Wenzig E. y Gotz F.- *Biochemistry.* 28, 9278 (1989)
- 33 Isobe K. y Nokihara K.- "*Lipases: structure, mechanism and genetic engineering*". Eds. VNH. L.Alberghina, R.D. Schmid; R.Verger. (Weinheim, Alemania) (1991)
- 34 Hofelmann M.; Hartman J.; Zink A. y Schreier P.- *J.Food Sci.* 50, 1721 (1990)
- 35 Nagaoka K. y Yamada Y.- *Agric.Biol.Chem.* 37, 2791 (1973)
- 36 Boel E.; Hüge-Jensen B.; Christensen M.; Thim L. y Fiil N.P.- *Lipids* 23, 701 (1988)
- 37 Sugiura M. y Isobe M.- *Chem.Pharm.Bull.*, 23, 1226 (1975)

- 38 Watanake N.; Ota Y.; Minada Y. y Yamada K.- *Agric.Biol.Chem.*, 41, 1353 (1977)
- 39 Elwan S.H.; El-Nagger M.R. y Ammar M.B.- *Bull.Fac.Sci.Riyadh University*, 8, 105 (1977)
- 40 Macrae A.R.- *J.Am.Oil Chem.Soc.*, 60, 291 (1984)
- 41 Posorske L.H.- *J.Am.Oil Chem.Soc.* 61(11), 1758 (1984)
- 42 Sugihara A.; Shimada Y. y Tominaga Y.-*Appl.Microbial.Biotech.*, 35, 738 (1991)
- 43 Iwai M. y Tsujisaka Y.- "*Lipases*". Eds. Borgstrom B. y Brockman H.L., Elsevier Science Publishers (Amsterdam, Holanda) (1984)
- 44 Alford J.A.; Prierce D.A. y Suggs F.G.- *J.Lipid Res*, 5, 390 (1964)
- 45 Jensen R.G.; Sampugna J.; Guinn J.G.; carpenter D.L. y Marks T.A.- *J.Am.Chem.Soc.* 42, 1029 (1965)
- 46 Derewenda U.; Swenson L.; Green R.; Wei Y.; Yamaguchi S.; Joerger R.; Haas M.J. y Derewenda Z.S.- *Prot.Engin.*, 7(4), 551 (1994)
- 47 H. L. Brockman.- "*Lipases*". Eds. B. Borgstrom; H. L. Brockman. Elsevier Science Publishers (Amsterdam, Holanda) 4 (1984).
- 48 H. Brockerhoff, R.G. Jensen.- "*Lipolytic Enzymes*". Academic Press (New York, EEUU) (1974).
- 49 Desnuelle P.; Sardá L. y Aihaud G.- *Biochim.Biophys.Acta* 37, 570 (1960)
- 50 White S.P.- *Science* 250, 1560 (1990).
- 51 Scott D.L.- *Science* 250, 1563 (1990).
- 52 Blow D.- *Nature* 351, 444 (1991).
- 53 Verger R.- "*Methods in Enzymology*". Purich D. L., ed. Academic Press (New York, EEUU) 64, 340
- 54 Brockman H.L.; Momsen W.E. y Tsujtta T.- *J.Am.Org.Chem.Soc.* 65(6), 891 (1988).
- 55 Antonov K.; Ayakov V.L.; Mishin A.A. y Rotanova T.V.- *Biochimie*, 70, 1235 (1989).
- 56 Kierkels J.G.T.; Vleugels L.F.W.; Kern J.H.A.; Meijer E.M. y Kloostermon M.- *Enz.Microb. Technol.* 12, 760 (1990).

- 57 Brockman H.L. y Muderhawa M.- "*Lipases: Structure, Mechanism and genetic Engineering*." Eds. L. Alberghina; R. D. Schmid; R. Verger. VCH (Weinheim, Alemania) 95 (1991).
- 58 Brady L.; Brzozowski A.M.; Derewenda Z.S.; Dodson E.; Dodson G.; Tolley S.; Turkenburg J.P.; Christiansen L.; Huge-Jensen B.; Norskov L.; Thim L. y Menge U.- *Nature* 343, 767 (1990).
- 59 Brzozowski A.M.; Derewenda U.; Derewenda Z.S.; Dodson G.G.; Lawson D.M.; Turkenburg J.P.; Bjorkling F.; Huge-Jensen B.; Patkar S.A. y Thim L. - *Nature* 351; 491 (1991).
- 60 Derewenda U.; Brzozowski A.M.; Lawson D.M.; Derewenda Z.S. - *Biochemistry*. 31, 1532 (1992)
- 61 Fink A.L.- "*Enzyme Mechanisms*". Ed. Page M.I. y Williams A. Royal Soc. of Chem. (Londres, Reino Unido) (1987).
- 62 Walsh C.- "*Enzymatic reaction mechanisms*", 1ª ed. Eds. W.H.Freeman and Co. (San Francisco, EEUU) (1979)
- 63 Michaelis L. y Menten M.L.- *Biochemistry. Z.* 49, 333(1913)
- 64 Lineweaver H. y Burk D.- *J.Am.Chem.Soc.* 56, 658 (1934)
- 65 Eadie G.S.- *J.Biol.Chem.* 146, 85 (1942)
- 66 Hofstee B.H.J.- *Nature, Lond.* 184,1296 (1959)
- 67 Dowd J.E. y Riggs D.S.- *J.Biol.Chem.* 249, 863 (1965)
- 68 Atkins G.L. y Nimmo I.A.- *Biochem.J.* 149, 775 (1975)
- 69 Cornish-Bowden A.- "*Fundamentals of Enzyme Kinetics*" Ed. Butterworth (London, Reino Unido) 99 (1979)
- 70 Chen C.S.; Sih C.J.- *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* 28; 695 (1989)
- 71 Cleland W.W.- *Biochemistry* 14; 3220 (1975)
- 72 Chen C.S.; Fujimoto Y.; Girdaukas G. y Sih C.J.- *J.Am.Chem.Soc.* 104; 7294 (1982)
- 73 Chen C.S.; Wu S.H.; Girdaukas G. y Sih C.J.- *J.Am.Chem.Soc.* 109, 2812 (1987)
- 74 Bianchi D.; Cesti P. y Battistel E.- *J.Org.Chem.* 53; 5531 (1988)

-
- 75 Aldercreutz P. y Mattiason B.- *Biocatal.* 1; 99 (1987)
- 76 Brooks C.J. y Gilbert M.T.- *J.Chromatogr.* 99, 541 (1974)
- 77 Goto J.; Goto N. y Nambara T.- *J.Chromatogr.* 239; 559 (1982)
- 78 Bojarski J.- *J.Chromatogr.* 12; 2685 (1989)
- 79 Branden C. y Tooze J.- "*Introduction of Protein Structure*". Ed.Garland (New York, EEUU) 1991.
- 80 Burke P.A.; Griffin R.G. y Klibanov A.M.- *Biotechnol. Bioeng.* 42, 87 (1993)
- 81 Affleck R.; Haynes C.A. y Clark D.S.- *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89,1567 (1992)
- 82 Zaks A. y Klibanov A.M.- *J.Biol.Chem.* 263, 3194 (1988)
- 83 Fitzpatrick P.A.; Steinmetz A.C.V.; Ringe D. y Klibanov A.M.- *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90, 8653 (1993)
- 84 Wescott C.R. y Klibanov A.M.- *Biochim. Biophys. Acta* 1206; 1 (1994).
- 85 Zaks A. y Klibanov A.M.- *Science* 244, 1249 (1984)
- 86 Garza-Ramos G.; Darszon A.; Tuena de Gómez-Puyou M. y Gómez-Puyou A.- *Biochemistry* 29, 751 (1990)
- 87 Volkin D.B.; Staubli A.; Langer R. y Klibanov A.M.- *Biotechnol. Bioeng.* 37, 843 (1991)
- 88 Cremonesi P.; Carrea G.; Ferrara L. y Antonini E.- *Eur.J.Biochem.* 44, 401 (1974)
- 89 Kazandjian R.Z.; Dordick J.S. y Klibanov A.M.- *Biotechnol.Bioeng.* 28, 417 (1986)
- 90 Gorman L.A.; Dordick J.- *Biotechnol.Bioeng.* 39; 392 (1992)
- 91 Rodionova M.V.; Belova A.B.; Mozhaev V.V.; Martinek K. y Berezin I.V.- *Chem.Abstr.* 106, 171823 (1987); *Dokl.Akad.Nauk. USSR.* 292, 913 (1987)
- 92 Leo A.; Hansch C. y Elkins D.- *Chem.Rev.* 71; 525 (1971)
- 93 Harnisch M.; Möckel H.J. y Schulze G.- *Chromatogr.* 282, 315 (1983)

Bibliografía

- 94 Laane C.; Boeren S.; Hilhorst R. y Verger C. "*Biocatalysis in organic media*". Eds. Laane C.; Tamper J. y Lilly M.D. Ed. Elsevier Sci. Publish. (Amsterdam, Holanda) (1987)
- 95 Laane C.- *Biocatal.* 1; 17 (1987)
- 96 Laane C.; Boeren S.; Vos K. y Veeger C.- *Biotechnol.Bioeng.* 30, 81 (1987)
- 97 Bosetti A.; Bianchi D.; Cesti P. y Golini P.- *Biocatal.* 2, 71 (1994)
- 98 Miller C.; Austin H.; Posorske L.; Gonzalez J. - *J.Am.Oil Chem.Soc.* 65(6); 927 (1988)
- 99 Martinek K; Semenov A.N. y Berezin I.V.- *Biochim.Biophys Acta* 658; 76 (1981)
- 100 Yang B.; Kuo S-J; Hariyadi P.; Parkin K.L.- *Enz.Microb.Technol.* 16; 577 (1994)
- 101 Schulz G.E. y Schirmer R.H.- "*Principles of protein structure*". Ed. Springer-Verlag (New York, EEUU) (1979)
- 102 Creighton T.E.- "*Proteins*". Ed. Freeman (New York, EEUU) (1983)
- 103 Tanford C.- "*Physical Chemistry of Macromolecules*". Ed.Wiley (New York,EEUU) (1961)
- 104 Halling P.J.- *Enz.Microb.Technol.* 16; 178 (1994)
- 105 Goderis H.L.; Ampe G.; Feyten M.P.; Fouwé; Guffens W.M.; Van Cauwenbergh S.M.; Tobback P.P.- *Biotechnol.Bioeng.* 30; 258 (1987).
- 106 Careri G.; Gratton E.; Yang P.H. y Rupley J.A.- *Nature* 284; 572 (1980)
- 107 Gorman L.A.; Dordick J.- *Biotechnol.Bioeng.* 39; 392 (1992)
- 108 Halling P.J.- *Biochim.Biophys.Acta*1040; 225 (1990)
- 109 Valivety R.H.; Halling P.J. y Macrae A.R.- *Biochim.Biophys. Acta* 1118; 218 (1992)
- 110 Kvittingen L.; Sjursnes B.; Anthonsen T. y Halling P.J.- *Tetrahedron* 48; 2793 (1992)
- 111 Norin M.; Boutelje J.; Holmberg E. y Hult K.- *Appl.Microb.Biotechnol.* 28; 527 (1988)
- 112 Ross N.W. y Schneider H.- *Enz.Microb.Technol.* 13; 370 (1991)
- 113 Yamane T.; Ichiryu T.; Nagata M.; Veno A. y Shimizu S.- *Biotechnol.Bioeng.* 36; 1063 (1990)

- 114 Tanaka T.; Ono E.; Ishihara M.; Yamanaka S. y Takinami K.- *Agric.Biol.Chem.* 45; 2387 (1981)
- 115 Kitaguchi H. y Klibanov A.M.- *J.Am.Chem.Soc.* 111; 9272 (1989)
- 116 Reslow M.; Aldercreutz P. y Mattiasson B.- *Biocatal.* 6; 307 (1992)
- 117 Reslow M.; Aldercreutz P. y Mattiasson B.- *Eur.J. Biochem.* 172; 573 (1988)
- 118 Kawamoto T.; Sonomoto K. y Tanaka A.- *Biocatal.* 1; 137 (1988)
- 119 Adlercreutz P.- *Eur.J.Biochem.* 199; 609 (1991)
- 120 Valivety R.H.; Halling P.J.; Peilow A.D. y Macrae A.R.- *Biochim.Biophys. Acta* 1122; 143 (1992)
- 121 Valivety R.H.; Halling P.J.; Peilow A.D. y Macrae A.R.- *Eur.J.Biochem.* 222; 461 (1994)
- 122 Oladepo D.K.; Halling P.J. y Larsen V.F.- *Biocatal.* 8; 283 (1994)
- 123 Cabral J.M.S.M; Best D.; Boross L. y Tramper J.- "*Applied Biocatalysis*", 1ªed. Eds. Harwood Academic Publishers (1993)
- 124 Bjorkling F.; Godtfredsen S.E. y Kirk O.- *J.Chem.Soc.Chem.Commun.* 1301 (1990)
- 125 Pulido R.; López-Ortiz F. y Gotor V.- *J.Chem.Soc.Perkin Trans.I* 1 (1992)
- 126 Testa B. y Mayer M.- *Prog.Drug Res.* 32; 249 (1988)
- 127 Beckett A.- *Biochem.Soc.Trans.* 19; 443 (1991)
- 128 Ariens E.- *J.Med.Res.Rev.* 6; 451 (1986)
- 129 Ariens A.- *J.Biochem.Pharmacol.* 37; 9 (1988)
- 130 Borman S.- *Chem.Eng.News*; Junio; 5 (1992)
- 131 Cayen M.N.- *Chirality* 3; 94 (1991)
- 132 Margolin A.- *Enz.Microb.Technol.* 15; 266 (1993)
- 133 Davies H.G., Green R.H., Kelly D.R. y Roberts S.M.- "*Biotransformations in preparative organic chemistry*". Academic Press. (Londo, Reino Unido) (1989)

Bibliografía

- 134 Faber K.- *"Biotransformations in Organic Chemistry"*. Springer Verlag. (Heidelberg, Alemania) (1992)
- 135 Poppe L. y Novak L.- *"Selective Biocatalysis"*. Ed. VCH. (Weinheim, Alemania) (1992).
- 136 Wong C.H. y Whitesides G.M.- *"Enzymes in Synthetic Organic Chemistry"*. Ed. Pergamon (Oxford, Reino Unido) (1994).
- 137 Santaniello E.; Ferraboschi P.; Grisenti P. y Manzocchi A.- *Chem. Rev.* 92, 1071 (1992)
- 138 Theil F.- *Chem Rev.* 95, 2203 (1995)
- 139 Lamén K.; Breitgoff D. y Schneider M.P.- *J.Chem.Soc.Chem.Commun.* 1459 (1988)
- 140 Bianchi D.; Cesti P. y Battistel E.- *J.Org.Chem.* 53, 5531 (1988)
- 141 Bjorkling F.; Godtfredsen S.E. y Kirk O.- *J.Chem.Soc. Chem.Commun.* 934 (1989)
- 142 Terao Y.; Murata M.; Achima K.; Nishio T.; Akantsu M. y Kamimura M.- *Tetrahedron Lett.* 29, 5173 (1988)
- 143 Scilimati A.; Ngooi T.K.; Sih C.J.- *Tetrahedron Lett.* 29, 4927 (1988)
- 144 Xie Z.F.; Nakamura I.; Suemune H. y Sakai K.- *J.Chem.Soc.Chem.Commun.* 966 (1988).
- 145 Mori K. y Takeuchi T.- *Tetrahedron* 44, 333 (1988).
- 146 Laumen K.; Schneider M.P.-*J.Chem.Soc.Chem.Commun.* 598 (1988).
- 147 Cotterill I.C.; McFarlane E.L.A. y Roberts S.M.- *J.Chem.Soc.Perkin Trans. I*, 3387 (1988)
- 148 Saf R.; Faber K.; Penn G. y Griengl H.- *Tetrahedron* 44, 339 (1988)
- 149 Miyazawa T.; Takitani T.; Ueji S.; Yamada T. y Kuwata S.- *J.Chem.Soc.Chem.Commun.* 1214 (1988)
- 150 Faber K.; Honig H. y Seuffer-Waserthat P.- *Tetrahedron Lett.* 29, 1903 (1988)
- 151 Hoshino O.; Itoh K.; Unezawa B.; Akita H. y Oishi T.- *Tetrahedron Lett.* 29, 567 (1988)

- 152 Xie Z.F.; Suemune H. y Sakai K.- *J.Chem.Soc.Chem.Commun.* 1638 (1988)
- 153 Suemune H.; Tanaka M.; Obaishi H. y Sakai K.- *Chem.Pharm. Bull.* 36, 15 (1988)
- 154 de Jeso B.; Drouillard S.; Degueil-Castaing M.; Soux A. y Maillard B.- *Synthetic Commun.* 18, 1699 (1988)
- 155 Kloosterman M.; Elferink V.H.M.; van Iersel J.; Roskam J.H.; Meijer E.M.; Hulshof L.A. y Sheldon R.A.- *Trends in Biotech.* 6, 251 (1988)
- 156 Rietschel E.T.- "*Handbook of Endotoxin*". vol.1. Ed. Rietschel E.T. Elsevier Science Publishers (Amsterdam, Holanda) (1984)
- 157 Klibanov A.M.- *Chentech.*354 (1986)
- 158 Chopieau J.; McCafferty F.D.; Therisod M. y Klibanov A.M.- *Biotechnol. Bioeng.* 31, 208 (1988)
- 159 Jommi G.; Orsini F.; Sisti M. y Verotta L.- *Gazz. Chim. It.* 118, 863 (1988)
- 160 Hennen W.J., Sweers H.M., Wang Y.F., Wang C.H.- *J.Org.Chem.* 53, 208 (1988)
- 161 Wong Y.F. y Wang C.H.- *J.Org.Chem.* 53, 5531 (1988)
- 162 Bovara R.; Carrea G.; Ferrara L. y Riva S.- *Tetrahedron Assym.* 2, 931 (1991)
- 163 Gou D.M.; Liu Y.C. y Chen C.S.- *J.Org.Chem.* 58, 1287 (1993)
- 164 Carrea G.; Danieli B.; Palmisano G.; Riva S. y Santagostino M.- *Tetrahedron Assymetry* 3, 775 (1992)
- 165 Theil F.; Ballschuch S.; Schick H.; Haupt M.; Häfner B. y Schwarz S.- *Synthesis* 540 (1988)
- 166 Theil F.; Schick H.; Lapitskaya M.A. y Pivnitsky K.K.- *Liebigs Ann.Chem.* 195 (1991)
- 167 Johnson C.R. y Bis S.J.- *Tetrahedron Lett.* 33, 7287 (1992)
- 168 Cooney M.A.A. y Emerson.- "*Thermophilic fungi*". Ed.W.H. Freeman and Co. (San Francisco, EEUU) 17 (1964)
- 169 Schipper M.A.- *Studies in Mycology* 17; 53 (1978)
- 170 Scholer; Müller; Schipper.- "*Fungi pathogenic for humans and animals*" Part A.- *Biology*. Ed. Dexter H.Howard; 42 (1982)

Bibliografía

- 171 Moskowitz G.J.; Cassaigne R.; West I.R. y Feldman L.I.- *J.Agric.Food Chem.* 25; 1146 (1977)
- 172 Kilara A.- *Process Biochem.* 20; 36 (1985)
- 173 Hüge-Jensen B.; Galluzo D.R.; Jensen R.G.- *Lipids* 22(8); 559 (1987).
- 174 Hüge-Jensen B.; Galluzo D.; Jensen R.- *J.Am.Oil Chem. Soc.* 65; 905 (1988)
- 175 Hüge-Jensen B.; Boel E.; Thim L.; Christensen M.; Andreasen F.; Christensen T.- Presentado en el "15. Nordiske Lipids Symposium" (Rebild, Dinamarca) 11-15-Junio 1989
- 176 Christensen T.; Woeldike H.; Boel E.; Mortenen S.B.; Hjortshøj K.; Thim L. y Hansen M.T.- *Biotechnology* 6; 1419 (1988)
- 177 Hüge-Jensen B.; Andreasen F.; Christensen T.- *Lipids* 24(9); 781 (1989)
- 178 Derewenda Z.S., Derewenda U. y Dodson G.G.- *J.Mol.Biol.* 227, 818, (1992)
- 179 Norin M.; Olsen O.; Svendsen A.; Edholm O. y Hult K.- *Prot.Engin.* 6(8), 855 (1993).
- 180 Kabsch W. y Sander C.- *Biopolymers* 22, 2577 (1983)
- 181 Richardson J.- *Advan.Prot.Chem.*, 34, 167-254, (1981).
- 182 Leszczynski J.F. y Rose G.D.- *Science*, 234, 849-855 (1986)
- 183 C.M. Venkatachalam.- *Biopolymers* 6, 1425, (1968).
- 184 Rees D.C.; Lewis M. y Lipscomb W.N.- *J.Molec.Biol.* 168, 367 (1983).
- 185 Baker E.N. y Hubbard R.E.- *Progr.Biophys.Mol.Biol.* 44, 97 (1984)
- 186 Kraut J.- *Ann.Rev.Biochem.* 46, 331 (1977)
- 187 Norin M.; Haeffner F.; Achour A.; Norin T.; Hult K.- *Prot.Science* 3, 1493 (1994)
- 188 Holmquist M.; Norin M. y Hult K.- *Lipids*, 28(8), 721 (1993)
- 189 Holmquist M.; Martinelle M.; Berglund P.; Clausen I.G.; Patkar S.; Svendsen A. y Hult K.- *J.Prot.Chem.* 12(6), 749 (1993)
- 190 "Enzyme Engineering".- Ed. L.B. Wingard. Interscience Publishers. (New York, EEUU) (1972)

-
- 191 R.F. Taylor.- *"Protein immobilization: fundamentals and applications"*.- Ed. Marcel Dekker Inc. (New York, EEUU) (1991).
- 192 Sinisterra J.V.- *Industria Farmacéutica* 2; 33 (1992)
- 193 Reslow M.; Adlercreutz P. y Mattiason.- *B.Eur.J.Biochem.* 172, 573 (1988)
- 194 Goldman R.; Goldstein L. y Katchalski E.- *"Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports"*.- Ed. Stark G. Acad. Press New York (1971).
- 195 Gabel D. y Kasche V.- *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 48; 1011 (1972)
- 196 Tanizawa K. y Bender M.L.- *J.Biol.Chem.* 249; 2130 (1974)
- 197 Martinek K.; Goldmacher V.S.; Klibanov A.M. y Berezim I.V.- *Febs.Lett.* 51; 152 (1975)
- 198 Martinek K.; Klibanov A.M.; Goldmacher V.S.; Thernysheva A.V.; Mozhaev V.V.; Berezim I.V. y Glotov B.O.- *Biochim. Biophys. Acta* 485 (1977) 13.
- 199 O.M. Poltorak, E.S. Tchukhray y A.N. Pryakhin. *"Advances in Biorganic Catalysis"*. Eds. I.V. Berezim y K. Martinek MSU Press Moscou. 1
- 200 Royer G.P. y Uy. *J. Biol. Chem.* 248;2627 (1973)
- 201 Laidler K.J. y Sundaran P.V.- *"Chemistry of the Cell Interface" Part A.* Ed.H.D. Brown. Acad. Press New York-London (1971).
- 202 Brown G.; Thomas D. y SelegnyE.- *J. Membr.Biol.* 8; 313 (1972)
- 203 Martinek K. y Mozhaev V.V.- *Advances in Enzymology* 57; 179 (1987)
- 204 Karube I.; Yugeta Y. y Suzuk S.- *Biotechnol. Bioeng.* 19; 1493 (1977)
- 205 Bailey J.E. y Ollis D.F.- *"Biochemical Engineering Fundamentals"*. Ed.McGraw-Hill Book Co. (New York , EEUU) 180 (1986)
- 206 Moitra S.; Mundhara G.L; Mishra R.K. y Tinari J.S.- *J.Ind.Chem.Soc.* 61; 50 (1984)
- 207 Marlott C.; Langrand G.; Triantaphylides C. y Baratti J.- *Biotechnol. Lett.* 7; 647 (1985)
- 208 Boyd S.A. y Mortland M.M.- *J.Mol.Catal.* 34; 1 (1986)

Bibliografía

- 209 Lambercht R.D.H.; Slegers G.; Mannens G. y Claeys A.- *Enz.Microb. Technol.* 9; 235 (1987)
- 210 Lieberman R.B. y Ollis D.F.- *Biotechnol. Bioeng.* 17; 1401 (1975)
- 211 Macrae A.R.- "*Biocatalysis in Organic Syntheses*". Eds. J. Tramper y cols. Elsevier Science Publishers (Amsterdam, Holanda) 195 (1985)
- 212 Kosugi Y.; Igusa H. y Tomizuka N.- *Yukagaku* 36; 67 (1987)
- 213 Lavayre J. y Baratti J.- *Biotechnol. Bioeng.* 24; 1007 (1982)
- 214 Yokozeki K.; Yamanaka S.; Takimani K.; Hirose Y.; Tanaka A.; Sonomoto K. y Kukui S.- *Eur.J.Appl.Microbiol.Biotechnol.* 17; 107 (1983)
- 215 Jensen B.H.; Galluzo D.R. y Jensen R.G.- *J.Am.Oil Chem.Soc.* 65; 905 (1988)
- 216 Posorske L.H.; Lefebver G.K.; Miller C.A.; Hansen T.T. y Glening B.L.- *J. Am.Oil Chem.Soc.* 65; 922 (1988)
- 217 Hansen T.T. y Eigtved P.- "*Proceedings of the world Conference on Emerging Trends in the Fats and Oil Industry*". Eds. R.A. Baldwin. Am.Oil Chemist's Soc. Champaign, IL; 365 (1986)
- 218 Kay G. y Crook E.M.- *Nature* 216; 514 (1967)
- 219 Kobayashi T.; Kato I.; Ohmiya K. y Shimizu S.- *Agric.Biol.Chem.* 44; 413 (1980)
- 220 Guyton A.C.- "*Tratado de Fisiología Médica*" 7ªed. Ed. Interamericana McGraw-Hill (1988)
- 221 Brooks P.M. y Day R.O.- *News Engl.J.Med.* 324, 1716 (1991)
- 222 Weismann G.- *Hosp.Prac.* 26, 60 (1991)
- 223 Adams S.S. y Cobb R.- *Nature* 181, 773 (1958)
- 224 Cavallani G.; Massarani E.; Nardi D. y Ambrosio R.D.- *J.Am.Chem.Soc.* 79, 3514 (1957)
- 225 Simonyl M.- *Med.Chem.Rev.* 4; 359 (1984)
- 226 Harrison I.T.; Nelson P.; Rooks W.H.; Roszkowski A.; Tomolonis A. y Friend J.H.- *J. Med. Chem.* 13, 203 (1970)

- 227 Wechter W.J.; Loughhead D.G.; Reischer R.J.; van Giessen G.J. y Kaiser D.G.- *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 61, 833 (1974)
- 228 W.J. Wechter, R.J. Reischer, G.J. Van Giessen y D.G. Kaiser.- *J.Pharm.Sci.* 65, 269 (1976)
- 229 Lee E.J.D.; Williams K.M.; Graham G.G.; Day R.O. y Champion G.D.- *J.Pharm.Sci.* 73, 1542 (1984)
- 230 Williams K.; Day R.; Knihinicki R. y Duffield K.- *Biochem.Pharm.* 35; 3403 (1986)
- 231 Hutt A.J. y Caldwell J.- *J.Pharm.Pharmacol.* 35; 693 (1983)
- 232 Willkens R.F.- *J.Rheumatol.* 19(36), 9 (1992)
- 233 Orme M.L.- *Agents Actions* 17, 151 (1985)
- 234 Florez J.- "*Farmacología humana*" 2ªed. Ed. Masson-Salvat medicina (Barcelona, España), 315 (1994)
- 235 Segre E.J.- *Clin.Rheum.Dis.* 5, 411 (1979))
- 236 Tsuchiashi G.; Mitamura S.; Kitajima K. y Kobayashi K.- *Tetrahedron Lett.* 23; 5427 (1982)
- 237 Consiglio G.; Pino P.; Flowers L.I. y Pittman C.U.- *J.Chem.Soc.Chem.Commun.* 612 (1983)
- 238 Hiyama T. y Wakasa N.- *Tetrahedron Lett.* 26; 3259 (1985)
- 239 Gu Q.M.; Chen C.S. y Sih C.J.- *Tetrahedron Lett.* 27; 1763 (1986)
- 240 Sih C.J.; Gu Q.M. y Reddy D.R.- *Trends in Medicinal Chemistry* Ed. E. Mutschler y E. Winterfeldt. VCH (Alemania) (1987).
- 241 Rantakylä M.; Altonen O.- *Biotech.Lett.* 16(8); 825 (1994)
- 242 Mustranta A.- *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 38; 61 (1992)
- 243 Hernáiz M.J.; Sánchez-Montero J.M. y Sinisterra J.V.- *Tetrahedron* 50; 10749 (1994)
- 244 de Zoete M.C.; Kock van Dale A.C.; van Rantwijk F. y Sheldon R.A.- *J.Chem.Soc.Che.Commun.* 1831 (1993)
- 245 Tsai S.W. y Wei H.J.- *Enz.Microb.Technol.* 16; 328 (1994)

Bibliografía

- 246 Gu Q.M.; Chen C.S. y Sih C.J.- *Tetrahedron Lett.* 27; 1763 (1986)
- 247 Patente Europea nº WO 9325703 A
- 248 Sih C.J.; Gu Q.M.; Fulling G.W.S.H. y Reddy D.R.- *Dev.Ind.Microb.* 221 (1988)
- 249 Perrin D.D. y Armarego W.L.F.- "*Purification of laboratory chemicals*" (3ª ed.). Ed. Pergamon Press (1988)
- 250 Novo enzymes preliminary product information sheet B 299g-GB 1000, Febrero-1991. Novo Industri A/S, Novo Alle, DK-2880 (Bagsvaerd, Dinamarca).
- 251 Novo enzymes preliminary product information sheet B 347-GB 400, Junio-1986. Novo Industri A/S, Novo Alle, DK-2880 (Bagsvaerd, Dinamarca).
- 252 Duolite A-568. Technical sheet DTS 0171A. Duolite International S.A. (París, Francia)
- 253 Eigtved P.; Hansen T.; Hüge-Jensen B.- Poster presentado en el "13th Scandinavian Symposium on Lipids" (Reykjavik, Islandia)(1985)
- 254 Bardsley W.G.- SIMFIT versión 4.0.- School of Biological Science. University of Manchester (Reino Unido). (1995).
- 255 HIPERCHEM™ versión 2.0 para Windows. Autodesk, INC.
- 256 Bruccoleri R.E. y Karplus M.- *Biopolymers* 29; 1847 (1990)
- 257 Gomall A.G., Bardawill C.S. y David M.M.- *J.Biol.Chem.* 177; 751 (1949).
- 258 Robinson H.W. y Hodgen C.G.- *J.Biol.Chem.* 135; 707 (1940).
- 259 Weichselbaum T.E.- *Am.J.Clin.Pathol.* 10; 40 (1946)
- 260 Bradford M.M.- *Anal.Biochem.* 72 (1976) 248.
- 261 Tietz N.W.; Fiereck E.A.- *Clin.Chim.Acta.* 13; 352 (1966).
- 262 Novo Nordisk's analytical method AF95. Enzyme Process Division. Novo Nordisk (Bagsveard, Denmark).
- 263 Laemmli U.K.- *Nature* 227; 680 (1970)
- 264 Lehninger A.L.- *Bioquímica* (2ª ed.) Ed.Omega (Barcelona, España) (1980)

- 265 Harris E.L.U. y Angal S.- *"Methods in a practical approach"*. Eds. Ricwood D. y Hames B.D. IRL Press (Oxford, Reino Unido)
- 266 Moreno J.M. y Sinisterra J.V.- *J.Mol.Catal.* 93; 357 (1994)
- 267 Mohr F.- *Ann.* 97, 335 (1856); recogido en el libro: *"Análisis Químico cuantitativo"*. Kolthoff I.M.; Sandell E.B.; Meeham E.J.; Bruckenstein S.; 4ª ed. Nigar Ed. (Buenos Aires, Argentina)
- 268 Dewing S.N. y Morgan S.L.- *"Experimental Design: A Chemometric Approach"*. Ed Elsevier Science Publishers. (Amsterdam, Holanda) (1987).
- 269 STATGRAPHICS. STSC Inc. 2115 East Jefferson Street. Rockville, MD 20852 (1992).
- 270 Vazquez-Lima F.; Pyle D.L. y Asenjo J.A.- *Biotechnol.Bioeng.*46; 69 (1995)
- 271 Gotham S.M.; Fryer P.J.; Patterson W.R.- *Anal.Biochem.* 173; 353 (1988)
- 272 Wang Y.J.; Wang F.F.; Sheu J.Y.; Tsai Y.C. y Shaw J.F.- *Biotechnol.Bioeng.* 39; 1128 (1992)
- 273 Middaugh C.R.; Matsuno K.; Vrona S. y Lawson E.Q. y Lewis R.V.- *Biotechnol.Bioeng.* 40; 8 (1992)
- 274 Lamare S.; Sánchez-Montero J.M. y Legoy M.D.- *Annal of New York Acad.Sci.* 672; 171 (1992)
- 275 Henley J.P. y Sadana A.- *Enz.Microb.Technol.* 7; 50-60 (1985)
- 276 Hansen T.T. y Eigtved P.A.- *"Proceedings of the World Conference on Emerging Technologies in the Fats and Oils Industry"* Ed. A.R.Baldwin, American Oil Chemist's Society, Champaign IL, 365 (1986)
- 277 (a) Eigtved P.; Hansen T.T. y Sakaguchi.- *J.Am. Oil Chem.Soc.* 63; 463 (1986)
(b) Sonnet P.E.- *J.Org.Chem.* 52; 3477 (1987)
(c) Sonnet P.E.- *J.Am.Oil Chem.Soc.* 65(6); 900 (1988)
- 278 García T.; Martínez M. y Aracil J.- *Enz.Microb.Technol.* 15; 607 (1993)
- 279 Box G.E.P. y Draper N.R.- *"Empirical model-building and responses surfaces"*. Eds. John Wiley and Sons, Inc. (New York, EEUU)(1987).
- 280 Daniel C.- *Technometrics* 1; 311 (1959)

Bibliografía

- 281 Boyer J.L.; Gilot B. y Guiraud R.- *Appl.Microb.Biotechnol.* 33; 372 (1990)
- 282 Heisler A.; Rabiller C. y Hublin L.- *Biotech.Lett.* 13; 327 (1991)
- 283 Stenning R.A.; Needs E.C.; Brooker B.E. y Vulfson E.N.- *Biotechnol.* 11; 1299 (1993)
- 284 Dudal Y. y Lortie R.- *Biotechnol.Bioeng.* 45; 129 (1995)
- 285 Svanholm H. - Presentado en "American Oil Chemist's Society Short Course on Speciality Fats (1-2 Mayo 1989)
- 286 Gandhi N.N.; Sawant S.B.; Joshi J.B. y Mukesh D.- *Enz.Microb.Technol.* 17, 373 (1995)
- 287 Manjón A.; Iborra J.L.; Arocas A.- *Biotech.Lett.* 13(5), 339 (1991)
- 288 Holmberg E.; Hult K.- *Biotech.Lett.* 13, 323 (1991)
- 289 Bornschauser U.; Schapder S.; Scheper T. y Schugerl K.- *Tetrahedron Assym.* 2; 1011 (1991)
- 290 Carrea G.; Ottolino G.; Riva S. y Secundo F.- "*Biocatalysis in non-conventional media*" Eds. Tramper J. et al. Eds. Elsevier Sci.Publishers. (1992).
- 291 Otto H.L.- *Chem.Biochem.Eng.* 4, 137 (1990)
- 292 Fischer K.- *Angew.Chem.* 48; 394 (1935)
- 293 Rizzi M.; Stylos P.; Rieka. y Reuss M.- *Enz.Microb.Technol.* 14; 709 (1992)
- 294 Tesis de Miguel Arroyo. Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid (1995)
- 295 Loose S.; Meusel D.; Muschter A. y Ruthe B.- *Die Nahrung* 34; 37 (1990)
- 296 Monot F.; Borzeix F.; Bardin M. y Vandecasteele J.P.- *Appl.Microb.Biotechnol.* 35, 759 (1991)
- 297 Chulalaksananukul W.; Condoret J.S.; Delorme P.; Willemot R.M.- *FEBS* 276(1); 181 (1990).
- 298 Gorman L.A.; Dordick J.- *Biotech.Bioeng.* 39; 392 (1992)

- 299 Laane C.; Boeren S.; Hilhorst R. y Verger C. "*Biocatalysis in organic media*". Eds. Laane C.; Tamper J. y Lilly M.D. Ed. Elsevier Sci. Publish. (Amsterdam, Holanda) (1987)
- 300 Branden C. y Tooze J.- "*Introduction of Protein Structure*". Ed. Garland (New York, EEUU) (1991).
- 301 Miller C.; Austin H.; Posorske L.; Gonzalez J. - *J.Am.Oil Chem.Soc.* 65; 927 (1988)
- 302 Galfield I.L.- *Lebensm-Wiss Technol.* 19, 87 (1986)
- 303 Schaltman; Aires-Barros M.R.; Cabral J.M.S. -*Biocatal.* 5; 137 (1990)

Presidentes:

Dr. Angel Villar

Vocales:

Dr. Cesar Gimenez

Dr. Cornelio Quevedo

Dr. Gabriel Herrera-Delgado

Secretario:

Dr. Emilio Blanes

Reunido, en el día de hoy, el Tribunal con

memoria se expresa, para juzgar esta tesis de

con unanimidad calificando

su apto cum laudem

en el día 22 de Marzo de 1996

El Secretario del Tribunal:

