

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Dpto. de QUÍMICA ORGÁNICA Y FARMACÉUTICA

OBTENCIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE LIPASAS DE "*Candida rugosa*": UTILIZACIÓN EN MEDIOS ORGÁNICOS CON a_w CONTROLADA.

TESIS DOCTORAL

ROSA M^a DE LA CASA FERNÁNDEZ

Madrid, 1999

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia

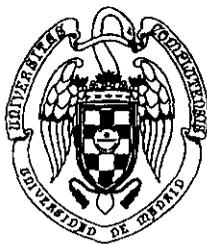
Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

OBTENCIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE LIPASAS DE "*Candida rugosa*": UTILIZACIÓN EN MEDIOS ORGÁNICOS CON a_w CONTROLADA.

Tesis Doctoral

ROSA M^{ao} DE LA CASA FERNÁNDEZ

MADRID 1999



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y FARMACÉUTICA

El Dr. José Vicente Gago, Catedrático de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y el Dr. José María Sánchez Montero, Profesor Ayudante de la citada Universidad.

CERTIFICAN:

que la presente Memoria titulada:

OBTENCIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE LIPASAS DE "*Candida rugosa*": UTILIZACIÓN EN MEDIOS ORGÁNICOS CON a_w CONTROLADA.

que presenta Dña. Rosa María de la Casa Fernández para optar al grado de Doctora en Farmacia, ha sido realizada bajo su dirección y reúne las condiciones necesarias para ser juzgada por el Tribunal correspondiente, autorizando así su presentación.

Y para que así conste donde proceda, firman el presente certificado en Madrid a 19 de Abril de 1999.

Fdo. José Vicente Sinisterra Gago

Fdo. José María Sánchez Montero



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y FARMACÉUTICA

D^a. M^a del Carmen Avendaño López, Catedrática y Directora del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICA:

que D^a Rosa María de la Casa Fernández ha realizado en los laboratorios de este Departamento, bajo la dirección de los Drs. José Vicente Sinisterra Gago y José María Sánchez Montero, el presente trabajo para optar al grado de Doctora en Farmacia, titulado:

OBTENCIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE LIPASAS DE "*Candida rugosa*": UTILIZACIÓN EN MEDIOS ORGÁNICOS CON a_w CONTROLADA.

Y para que así conste, firma la presente certificación en Madrid a 19 de Abril de 1999.

Fdo. M^a del Carmen Avendaño López

Parte de los resultados que se presentan en esta Memoria han sido expuestos en diferentes congresos nacionales e internacionales y han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Congresos.

- 1995 *Reunión Científica Pluridisciplinar* del 150 aniversario de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.
- 1996 "Importancia de la isoterma de adsorción de agua en reacciones catalizadas en medios orgánicos". VI Congreso de la Sociedad Española de Biotecnología.
- 1998 "Stabilization of lipases from *Candida rugosa* obtained in different fermenter conditions". International Symposium on *Stability and Stabilization of Biocatalyst*.
- 1998 "Water sorption isotherm as a tool to explore hydration of the microenvironment of biocatalysts". International Symposium on *Stability and Stabilization of Biocatalyst*.
- 1998 "Papel del agua y de sus miméticos en la activación-estabilización de la lipasa de *Candida rugosa*". Congreso Ibero-Americano de Biotecnología.

Publicaciones.

De la Casa, R.M.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. "Water adsorption isotherm as a tool to predict the preequilibrium water amount in preparative esterification". *Biotechnology Letters* **18** (1996) 13-18.

Sánchez-Montero, J.M.; **De la Casa, R.M.** y Sinisterra, J.V. "Water sorption isotherm as a tool to explore hydration of the microenvironment of biocatalysts" *Stability and Stabilization of Biocatalysts* (1998) 453-458. Ed. Ballesteros, A.; Plou, F.; Iborra, J.L. y Halling, P. Elsevier Sc. B.V.

De la Casa, R.M.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. "Stabilization of lipases from *Candida rugosa* obtained in different fermenter conditions" *Stability and Stabilization of Biocatalysts* (1998) 735-740. Ed. Ballesteros, A.; Plou, F.; Iborra, J.L. y Halling, P. Elsevier Sc. B.V.

De la Casa, R.M.; Sánchez-Montero, J.M.; Rojas, R. y Sinisterra, J.V. "Simple determination of the water content in lyophilized isoenzymes of *Candida rugosa*" *Biotechnology Techniques* **12** (1998) 823-827.

De la Casa, R.M.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. "Modification of hydrophilicity/hydrophobicity of the microenvironment of lipase of *Candida rugosa* by dextrans" *Biotechnology Letters* **21** (1999) 123-128.

De la Casa, R.M.; Sánchez, A.; Sinisterra, J.V.; Valero, F. y Sánchez-Montero, J.M. "Effect of fermentation conditions in the enzymatic activity and stereoselectivity of crude lipase" *Appl. Biochemistry & Biotechnology*. (Aceptado)

Sánchez, A.; Ferrer, P.; Serrano, A.; Valero, F.; Solà, C.; Pernas, M.; Rúa, M.L.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J.M.; **De la Casa, R.M.**; Sinisterra, J.V.; Sánchez-Montero, J.M. "A controlled fed-batch cultivation for the production of new crude lipases from *Candida rugosa* with improved properties in fine chemistry". *Journal of Biotechnology*. (Aceptado)

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas:

A mis directores de Tesis, Dr. José Vicente Sinisterra Gago y Dr. José María Sánchez Montero, por el apoyo y orientación que me han prestado a lo largo de la realización de este trabajo; y muy especialmente por los buenos momentos compartidos.

Al Dr. Sebastián Cerdán del Instituto de Investigaciones Biomédicas del CSIC, cuya colaboración y ayuda fue fundamental en la adquisición e interpretación de espectros pertenecientes al apartado de RMN de la presente Tesis.

A la Dra. Rosa Rojas del Instituto de Materiales del CSIC, por su ayuda y colaboración en el capítulo correspondiente al análisis termogravimétrico expuesto en la Memoria.

A la Dra. Montaña Cámara, profesora del Departamento de Bromatología de la Facultad de Farmacia, que tan amablemente me ayudó en el estudio y determinación de azúcares.

Al Dr. José Manuel Guisán del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del CSIC, por la confianza depositada al permitirme trabajar en su grupo de investigación; así como al Dr. Roberto Fernández-Lafuente. Ambos me ayudaron en todo momento y el ánimo transmitido fue importante y siempre será valorado.

Al Dr. Andrés Alcántara, que me ha alegrado cada uno de los días pasados en el laboratorio, por su espíritu alegre y por su buen humor; pero sobre todo un agradecimiento muy especial por su amistad y el interés mostrado en momentos difíciles.

A mis compañeros del Laboratorio, siempre tan amigos y pendientes de cualquier cambio. Sin su ayuda, muchos días hubieran sido grises, pero siempre han estado ahí tan sólo para dar una nota de color. A todos ellos nunca podré terminar de agradecer su ayuda y su amistad. Gracias a Marisol, que tan pacientemente me acompañó en los momentos de mayor desánimo. Gracias a Isabel, que siempre tuvo una palabra de entusiasmo para transmitir. Gracias a Isidoro, organizador de actividades extradepartamentales y chófer excepcional. Gracias a Pablo por su especial colaboración a la hora de transmitir energía durante la escritura de la Tesis. Gracias a Daniel, que continuamente me ha brindado su ayuda desinteresada. Gracias a los últimos fichajes, Nuria y Oscar, sucesores a los que deseo sinceramente toda la suerte del mundo en el maravilloso camino de la investigación. Tampoco quiero olvidar a todos aquellos que pasaron por este Laboratorio pero que seguirán permaneciendo en la

memoria: a Sonia con la que el apasionante mundo de la purificación proteica no fue tan frío; a Fernando, que siempre ha sabido transmitir ánimo y entusiasmo a pesar de sus escasas visitas; a los que me precedieron en este camino, a Chema, Miguel, Carlos, Maida y M^a José, sin su ayuda todo hubiera sido más difícil.

A todos los compañeros y amigos del Departamento; al personal docente y al laboral, a doctorandos y a tesinandos. Cada uno de ellos sabe que les guardo un lugar muy importante en mi corazón, sobre todo a los compañeros que empezamos juntos en este camino y a los que se han ido agregando con el tiempo. Gracias a Pilar, a Marisa y a las "Pepas" por los desayunos compartidos, y sobre todo gracias por vuestro apoyo.

A M^a José Saucedo, compañera de cuarto, con la que he podido desahogarme cuando los genios de la técnica no me eran propicios. Su compañía y amistad merecen un agradecimiento especial, juntas formamos un equipo de altura.

A José Álvarez por la ayuda ofrecida en mi paso por el IIB y sobre todo por su infinita paciencia y dedicación que siempre agradeceré. A Marisa, Toñi y Fátima, que me trataron estupendamente en cada una de mis visitas al Instituto.

A los inolvidables amigos que encontré en mi paso por Catálisis: M^a Carmen, Pilar, Pili, Olga, Rosa, César, Edmundo y sobre todo a Gloria, que tan pacientemente me ayudó en el trabajo realizado.

A los colegas de la *promoción del 93*, a los que veo mucho menos de lo que quisiera pero a los que nunca olvidaré. Gracias a Ángel Luís Álvarez, por ser el eslabón que aún me tiene en contacto con todos ellos. Quiero agradecer particularmente a Mercedes Arteaga su amistad, que a pesar del tiempo y de las circunstancias para mí guarda un valor especial.

A los de la pandilla: Esther, Luis-Mi, Julián y Miguel; y muy especialmente a Mario, Merche y José Luís, que han estado cerca dispuestos a escuchar y animar siempre que la ocasión lo requiera. A todos ellos, que siempre han estado interesados en mi trabajo y con los que he compartido tan buenos ratos, que ha sido imprescindibles para seguir adelante.

A mis amigos de *Latina*, especialmente a Lourdes, por saber escuchar y ofrecerme su confianza. A los miembros de la "Comisión Permanente", por los buenos momentos pasados. Al "Comité Ejecutivo" cuya amistad y apoyo significan mucho para mí.

A mis amigos de *San Antonio*, que me enseñaron a saber encontrar lo bueno de cada momento; especialmente a Víctor Ruiz, por ser un confidente de primera y cuya amistad siempre estará presente.

A los amigos de Bayuela que permanecieron a mi lado en el camino. Ellos saben que no les defraudaré.

A las integrantes del Club social del Laboratorio 6: a Maica, por ese viaje pendiente a Llanes; a Pilar, que tan generosamente me facilitó el acceso al mundo del etiquetado y a Pachi, cuya capacidad para transmitir buenas vibraciones no tiene límite.

A Jaime, Mario y Rosa que me han demostrado ser gente extraordinaria. La EOI nos unió y espero que el tiempo no disipe esta entrañable relación.

A Jesús Pacheco, uno de mis mejores amigos, que ha sabido en todo momento estar a mi lado y tener siempre una palabra de aliento y de ánimo.

A Jesús Carnero, por ser un amigo especial. Su admiración y amistad, no tienen precio.

A mi familia y especialmente a mis primos: Alvaro, Nuria, Alfredo, Yolanda, Oscar y Javier que siempre me han demostrado su confianza y su amistad y con los que he pasado muy buenos ratos en las noches toledanas.

A mis padres, por su amor, por su apoyo y por creer que esto sería posible. A mi hermana Julia, que siempre ha estado a mi lado cuando la he necesitado, sé que los años y la distancia no estropearan nuestra relación. A Lorenzo, que con el tiempo ya es casi como un hermano. A Iván y Sergio, que son la chispa de la casa y mi debilidad y que han sido capaces de distraer mi atención en los días más duros.

Gracias a todas las personas que a lo largo de este tiempo han tenido la paciencia de escuchar y han sabido alentar el desánimo y alegrarme con su presencia.

A mis padres.

*Cada uno tiene una Historia Personal,
pero es preciso transformarse en algo mejor,
y tener una nueva Historia Personal.*

*Cuando tratamos de ser mejores de lo que somos,
todo a nuestro alrededor se vuelve mejor también. (Maktub).*

"El Alquimista"

(Paulo Coelho)

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
1	INFLUENCIA DEL GRADO DE HIDRATACIÓN DEL MICROENTORNO DE LA ENZIMA EN SU ACTIVIDAD CATALÍTICA EN MEDIOS ORGÁNICOS.	3
11	Planteamiento general.	3
	<i>Sistemas microacuosos.</i>	5
12	Análisis del proceso catalítico empleando lipasas liofilizadas y medios orgánicos débilmente hidratados.	14
13	Influencia del método de preparación del catalizador sólido en su actividad/enantioselectividad.	16
14	Interacción enzima sólida/disolvente orgánico.	21
15	Importancia del agua del microentorno del catalizador sólido.	22
151	Aplicación de la RMN- ¹ H a la determinación de agua unida a la proteína.	23
	- <i>Aplicación de la RMN a la determinación del agua de hidratación de enzimas en estado nativo.</i>	23
	- <i>Aplicación de la RMN a la determinación del agua de hidratación de enzimas liofilizadas suspendidas en medios orgánicos.</i>	28
152	Isotermas de sorción de agua. Concepto de a_w .	30
	- <i>Definición del valor de a_w.</i>	31
	- <i>Unión del agua.</i>	34
	- <i>Métodos para la medida de a_w.</i>	36
	- <i>Influencia de a_w en procesos químicos, bioquímicos y biológicos.</i>	38
153	Análisis termogravimétrico de los biocatalizadores sólidos.	52
	- <i>Análisis térmico gravimétrico.</i>	52
	- <i>Análisis térmico diferencial.</i>	53
16	Técnicas de modulación del agua del microentorno.	57
161	Empleo de disolventes miméticos del agua.	58
162	Modificación no covalente del microentorno.	62
163	Modificación covalente del microentorno.	68
2	PRODUCCIÓN DE LIPASAS POR LA LEVADURA DE <i>Candida rugosa</i> .	75
21	Planteamiento general.	75
22	Isoformas de la lipasa de <i>Candida rugosa</i> .	78
23	Purificación de isoformas presentes en la lipasa cruda de <i>Candida rugosa</i> .	79
24	Actividad catalítica de las isoformas lipasa A y lipasa B de <i>Candida rugosa</i> .	81

2.5.	Lipasa semipurificada de <i>Candida rugosa</i> .	85
3.	IMPORTANCIA DE LAS LIPASAS EN LOS PROCESOS BIOCATALIZADOS.	85
4.	MODELIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENZIMA-SUSTRATO	95
4.1.	Conceptos básicos.	95
4.2.	Definición de campos de fuerza y funciones de energía potencial.	96
4.3.	Minimización de energía.	101
4.5.	Dinámica molecular.	103
II.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.	107
III.	PARTE EXPERIMENTAL.	111
1.	MATERIALES.	113
1.1.	Enzimas	113
1.2.	Productos	114
2.	MÉTODOS.	115
2.1.	CARACTERIZACIÓN DE LAS LIPASAS.	115
2.1.1.	Lipasa de <i>Candida rugosa</i> comercial (LCRC).	115
	A. Determinación de la cantidad de proteína.	115
	B. Medida de la actividad hidrolítica.	118
	C. Medida de la actividad ester sintetasa. Síntesis del oleato de heptilo.	122
	D. Desactivación por disolvente orgánico.	124
	E. Desactivación térmica en medio orgánico.	125
2.1.2.	Lipasa de <i>Candida rugosa</i> semipurificada (LCRS).	127
	A. Determinación de la cantidad de proteína.	128
	B. Medida de la actividad hidrolítica.	128
	C. Medida de la actividad ester sintetasa. Síntesis del oleato de heptilo.	128
	D. Desactivación térmica en medio orgánico.	128
2.1.3.	Lipasa A (LCRA) y Lipasa B (LCRB) puras de la lipasa de <i>Candida rugosa</i> comercial.	129
2.1.4.	Lipasas obtenidas en condiciones de fermentación controladas. <i>Lipasas UAB</i> .	134
	A. Determinación de la cantidad de proteína.	135
	B. Medida de la actividad hidrolítica.	135
	C. Medida de la actividad ester sintetasa. Síntesis del oleato de heptilo.	135

	D. Desactivación por disolvente orgánico de UAB.	136
	E. Desactivación térmica en medio orgánico.	136
2.2.	MODIFICACIÓN DE LAS LIPASAS DE PARTIDA CON DEXTRANOS.	137
2.2.1.	Complejo enzima-dextrano no covalente (LCRm).	137
	A. Determinación de la cantidad de proteínas.	139
	B. Determinación del grado de modificación.	139
2.2.2.	Modificación no covalente de UAB (UABm).	142
2.2.3.	Lipasa de <i>Candida rugosa</i> comercial modificada covalentemente (LCRM).	142
	A. Determinación de la cantidad de proteínas.	144
	B. Determinación de la cantidad de polisacárido unido covalentemente.	144
	C. Medida de la actividad ester sintetasa. Síntesis del oleato de heptilo.	144
	D. Desactivación térmica en medio orgánico.	145
2.3.	MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRATACIÓN.	146
2.3.1.	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DEL AGUA.	146
	A. Principios teóricos.	146
	B. Condiciones de análisis.	147
	1. RMN- ¹ H del agua en disolventes orgánicos.	147
	2. RMN- ¹ H del agua en un sistema bifásico.	147
	3. RMN- ¹ H del agua en las isoformas puras.	150
2.3.2.	ANÁLISIS TÉRMICO DIFERENCIAL (ATD) Y ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (ATG).	151
	1. Lipasa de <i>Candida rugosa</i> comercial.	152
	2. Lactosa monohidratada.	152
	3. Lipasa de <i>Candida rugosa</i> semipurificada.	153
	4. Lipasa A de <i>Candida rugosa</i> .	153
	5. Lipasa B de <i>Candida rugosa</i> .	153
	6. Lipasa UAB.	153
	7. Dextranos de diferente peso molecular.	154
2.3.3.	ISOTERMAS DE SORCIÓN DE AGUA.	155
	1. Secado del biocatalizador sólido.	156
	2. Secado de los disolventes.	157

2.3.3.1.	Isoterma de adsorción de agua para la preparación enzimática liofilizada en aire.	158
2.3.3.2.	Isoterma de absorción de agua de los disolventes.	158
2.3.3.3.	Isoterma de sorción para la mezcla de la lipasa y disolvente orgánico.	159
2.4.	REACCIONES.	160
2.4.1.	Resolución de la mezcla racémica de ácidos (<i>R,S</i>) 2-aryl propanoicos.	160
2.4.1.1.	Esterificación de ácidos (<i>R,S</i>) 2-aryl propanoicos en condiciones controladas de a_w .	160
	a) Condiciones de reacción.	161
	b) Análisis de muestras.	164
2.4.1.2.	Esterificación de los ácidos (<i>R,S</i>) 2-aryl propanoicos empleando lipasas de <i>Candida rugosa</i> de distinto origen como biocatalizadores.	166
2.4.1.3.	Esterificación del ácido (<i>S</i>) 2-(3'-benzoyl)-fenil propanoico catalizada por LCRC empleando cosolventes como miméticos del agua.	168
2.4.1.4.	Esterificación del ácido (<i>R,S</i>) 2-(4-isobutilfenil) propanoico empleando biocatalizadores modificados con dextranos.	169
2.4.2.	Transesterificación de alcoholes terpénicos vía síntesis enzimática.	170
2.5.	Modelización de la interacción enzima-sustrato.	173
2.5.1.	Elección de la zona de interacción con el sustrato.	174
2.5.2.	Estructura de los compuestos libres.	174
2.5.3.	Formación del complejo acil-enzima.	175
2.5.4.	Metodología de cálculo.	175
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	179
1.	CARACTERIZACIÓN DE LIPASAS	181
	A. Determinación de la cantidad de proteínas.	181
	B. Medida de la actividad hidrolítica.	186
	C. Medida de la actividad ester sintetasa.	190
	D. Desactivación de los biocatalizadores por disolvente orgánico.	194
	E. Determinación del grado de modificación de la enzima.	197
	F. Desactivación térmica en medio orgánico de los distintos biocatalizadores.	199
2.	MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRATACIÓN.	202
2.1.	Resonancia magnética nuclear del agua.	202
	1. RMN- ¹ H del agua en disolventes orgánicos.	202

2.	RMN- ¹ H del agua en un sistema bifásico.	204
	<i>a) Estudio de RMN ¹H de agua presente en fase orgánica.</i>	204
	<i>b) Estudio del agua presente en la fase acuosa.</i>	206
3.	Cuantificación del agua unida a las isoformas puras mediante la técnica de RMN- ¹ H.	214
2.2.	Análisis térmico diferencial (ATD) y análisis termogravimétrico (ATG)	218
1.	Lipasa de <i>Candida rugosa</i> comercial.	218
2.	Lactosa monohidratada.	219
3.	Lipasa de <i>Candida rugosa</i> semipurificada.	221
4.	Lipasa A de <i>Candida rugosa</i> .	222
5.	Lipasa B de <i>Candida rugosa</i> .	223
6.	Lipasa UAB.	225
7.	Dextranos de diferente peso molecular.	226
2.3.	Isotermas de sorción de agua.	229
1.	Isoterma de adsorción de agua de la preparación enzimática sólida en aire.	229
2.	Isoterma de absorción de los disolventes.	236
3.	Isoterma de sorción de la mezcla de la lipasa y disolvente orgánico.	238
3.	REACCIONES.	253
3.1.	Esterificación de ácidos (<i>R,S</i>) 2-aril propanoicos.	253
1.	Influencia del valor de a_w de preequilibrado inicial del sistema en la esterificación de ácidos (<i>R,S</i>) 2-aril propiónicos.	253
2.	Influencia de las condiciones de fermentación seguidas en la producción de lipasa sobre su actividad catalítica.	275
3.	Influencia de la presencia de cosolventes como miméticos del agua en la esterificación del ácido (<i>S</i>) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico usando la lipasa de <i>C. rugosa</i> .	287
4.	Influencia de dextranos como aditivos modificadores del biocatalizador en la esterificación del ácido (<i>R,S</i>) 2-(4-isobutilfenil) propanoico con n-propanol.	298
4.1.	Empleo de biocatalizadores modificados por unión no covalente.	298
	- <i>Influencia del peso molecular del dextrano en la actividad catalítica.</i>	299
	- <i>Influencia de la cantidad de agua añadida en la velocidad inicial al variar la relación enzima/dextrano.</i>	302
	- <i>Influencia del log P del disolvente.</i>	306

4.2.	Empleo de biocatalizadores modificados por unión covalente.	317
3.2.	Influencia del estado y origen del biocatalizador en la transesterificación de terpenos.	318
4.	MODELIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENZIMA-SUSTRATO.	325
4.1.	Elección de la zona de interacción con el sustrato.	325
	Anclaje del sustrato con el centro activo.	325
	Elección de la zona de interacción con el sustrato (R) o (S) ketoprofeno.	326
	Estudio conformacional del complejo S-ketoprofeno-LCR.	330
	Estudio conformacional del complejo R-ketoprofeno-LCR.	335
V.	CONCLUSIONES.	343

I.INTRODUCCIÓN

1. INFLUENCIA DEL GRADO DE HIDRATACIÓN DEL MICROENTORNO DE LA ENZIMA EN SU ACTIVIDAD CATALÍTICA EN MEDIOS ORGÁNICOS.

1.1. PLANTEAMIENTO GENERAL.

La integración de las biotransformaciones en el esquema global de síntesis de un producto va ganando terreno a la síntesis clásica a la hora de proyectar una síntesis a nivel preparativo. Esto ha impulsado el desarrollo de la llamada *Ingeniería del medio de reacción* donde se estudian los efectos que sobre la actividad catalítica ejercen no sólo la sustitución del medio acuoso de reacción por otro *no convencional*, sino también la adaptación del biocatalizador al nuevo microentorno producido por inmovilización, modificación química o la adición de aditivos.¹

Como ventajas principales resultantes de sustituir el medio acuoso por un medio orgánico podemos citar:

1) aumento de la solubilidad de los sustratos difícilmente solubles en agua, en el medio de reacción, lográndose una fase homogénea,

2) desplazamiento del equilibrio de la reacción hacia el proceso de síntesis en detrimento de la hidrólisis,

3) posibilidad de integrar *miméticos* del agua, como alcoholes, disolventes polares, polisacáridos, etc., que pueden favorecer el proceso de síntesis, al permitir reducir aún más la cantidad de agua del medio,

¹Vermüe, M.H. y Tramper, J. (1995) *Pure & Appl. Chem.*, **67**, 345-373.

4) disminución de la cantidad de agua en el medio, lo que disminuye la posibilidad de reacciones secundarias debidas al agua,

5) aumento del rendimiento, disminuyendo los fenómenos de inhibición enzimática,²

6) empleo de disolventes de bajo punto de ebullición, lo que facilita la recuperación de productos y del biocatalizador,

7) el biocatalizador no se disuelve en el medio de reacción, lo que facilita su recuperación,

8) la estabilidad térmica del biocatalizador aumenta en medios orgánicos frente al proceso en medio acuoso,^{3,4}

9) reducción de la contaminación bacteriana.

Según la naturaleza del disolvente, se distinguen cuatro metodologías de trabajo en biocatálisis preparativa.

1) Mezcla tampón acuoso/disolvente orgánico miscible. En estas condiciones el disolvente orgánico suele consistir en una parte, relativamente pequeña del medio (5-20 %).

2) Sistemas bifásicos tampón acuoso/disolvente orgánico inmiscible. En este caso se distinguen tres posibilidades:

2a. Biocatalizador solubilizado y baja cantidad de disolvente orgánico.

2b. Biocatalizador inmovilizado y pequeña cantidad de disolvente orgánico.

2c. Biocatalizador inmovilizado o liofilizado y alta cantidad de disolvente pero

² Vermúe, M.H. y Tramper, J. (1990) *Extractive biocatalyst in a liquid-inpelled loop reactor* en *Proceedings of the 5th European congress on Biotechnology*. Eds.: Christianen, C.; Munck, L.; Villadsed, J., Munksgaard Int. Pub., Copenhagen, Denmark, pags.: 243-246.

³ Zaks, A. y Klibanov, A.M. (1984) *Science*, **224**, 1249-1251.

⁴ Volkin, D.B.; Staubli, A.; Langer, R.; Klibanov, A.M. (1991) *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 843-853.

con una $a_w \approx 1$.

3) Sistemas microacuosos. Catalizador inmovilizado o liofilizado y $a_w < 1$.

4) Sistema de micelas reversas.

De todos ellos, en la presente Memoria nos hemos centrado en el caso 3, ya que las enzimas empleadas, nativas o modificadas químicamente, fueron liofilizadas previamente a su adición al disolvente orgánico inmiscible en agua, preequilibrado a $a_w < 1$.

Sistemas microacuosos.

Cuando la cantidad de agua se reduce a proporciones tales que es imposible distinguir visualmente dicha fase acuosa, nos encontramos ante las condiciones denominadas microacuosas.

Estrictamente hablando, la actividad catalítica de un biocatalizador es imposible sin agua. Siempre se requiere una cierta cantidad de agua para mantener las interacciones no covalentes que hacen que se mantenga la conformación activa, y que permitan, actuando a modo de lubricante, el ligero cambio conformacional que requiere el proceso catalítico para reconocer los reactivos y enviar los productos de reacción al macroentorno. Sin embargo, la cantidad mínima de moléculas de agua que es necesaria para ello depende del tipo de enzima y puede ser menor que una monocapa de moléculas de agua alrededor de la proteína.⁵ Así, por ejemplo la α -quimotripsina sólo necesita 50 moléculas de agua por molécula de enzima mientras que la polifenol oxidasa necesita $3,5 \cdot 10^7$ moléculas de agua por molécula de proteína.⁶ Klibanov y col. fueron uno de los primeros grupos que establecieron que para aumentar la actividad de la lipasa de *Candida rugosa* en reacciones de esterificación catalizadas en medio orgánico, era necesario

⁵ Klibanov, A.M. (1989) *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 141-144.

⁶ Dordick, J.S. (1989) *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 194-211.

una pequeña cantidad de agua;⁵ aunque en medios orgánicos la esterificación estuviera favorecida sobre la hidrólisis. No obstante, existe un cambio en la selectividad de las lipasas en función del disolvente utilizado como medio orgánico; aunque siguiendo esta línea Halling y col.⁷ apuntan que los cambios de solvatación del sustrato no implican alteraciones en la enantioselectividad siempre y cuando ambos enantiómeros sean solvatados igualmente en disolventes aquirales. Sin embargo, la solvatación del complejo enzima-enantiómero puede ser diferente y provocar, en consecuencia, cambios en la enantioselectividad.

Dado que los disolventes orgánicos poseen cierta afinidad por el agua dependiendo de su hidrofilia, cuando una partícula de enzima liofilizada o inmovilizada se añade a un medio orgánico en condiciones microacuosas, se produce un reparto del agua existente en el sistema entre el biocatalizador liofilizado y el medio. Evidentemente, cuanto más hidrófilo sea el disolvente, más agua se ha de añadir al medio para que el biocatalizador no pierda el agua esencial necesaria para que continúe siendo activo. No obstante, Zaks y Rusell⁸ han demostrado que si la cantidad de agua requerida para que una enzima sea activa, se expresara en moléculas de agua por moléculas de proteína, esta cantidad sería independiente del medio empleado.

Otro punto a considerar en el caso de los catalizadores liofilizados es el concepto de la *memoria* de la enzima introducido por Klibanov en 1995.⁹ Este autor demuestra que la enzima liofilizada en un determinado macroentorno, conserva al ser liofilizada, la conformación estadísticamente más probable que tenía en ese macroentorno y a la temperatura a la que estaba,

⁵ Klibanov, A.M. (1989) *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 141-144.

⁷ Valivety, R.H.; Halling, P.J.; Peilow, A.D. y Macrae, A.R. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1122**, 143-146.

⁸ Zaks, A. y Rusell, A.J. (1988) *J. Biotechnol.*, **8**, 259-270.

⁹ Klibanov, A.M. (1995) *Nature*, **374**, 536.

junto con un mínimo número de moléculas de agua, el cual depende, obviamente del pH del medio que condiciona la carga superficial de la proteína y de la presencia de aditivos, v.g. sales, lactosa, polímeros, impurezas, soporte, que también pueden retener agua. Si el agua que se retiene después de la liofilización es igual o ligeramente superior a la mínima necesaria, el catalizador liofilizado será activo en el medio orgánico; en caso contrario no será activo como biocatalizador.

Este mismo concepto de *memoria* de la enzima fue utilizado por el grupo de Klibanov para definir el concepto de *imprinting* o modelado de la proteína por el sustrato.¹⁰ Estos autores han observado que cuando una proteína se disuelve en una disolución de un compuesto orgánico multifuncional (ligando), la proteína una vez liofilizada y lavada con el disolvente orgánico muestra una mayor afinidad por el ligando. Si éste es sustrato de una reacción, el catalizador es más activo que el que no se ha sometido a este tratamiento. Estos autores apuntan a que los ligandos modulan la proteína creando cavidades donde se introducen (*imprinting*), las cuales permanecen después de la liofilización y lavado de la proteína liofilizada con el medio orgánico ya que en medios orgánicos apolares la estructura de la proteína es muy rígida. El *imprinting* de la lipasa ha sido utilizado igualmente por otros autores.¹¹

De todo ello se deduce que el agua y/o ligandos modulan la estructura que la proteína tendrá en el medio orgánico inmiscible en agua, una vez ha sido liofilizada.

La elección del mejor disolvente para la resolución enzimática es aún objeto de estudio. Laane y su grupo¹² clasificaron los disolventes en tres grupos teniendo en cuenta su log P.

¹⁰ Mishra, P.; Griebenow, K. y Klibanov, A.M. (1996) *Biotechnol. Bioeng.* **52**, 609-614.

¹¹ González-Navarro, H. y Braco, L. (1997) *J Mol. Catal. B: Enzymatic*, **3**, 111-119.

¹² Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Verger, C. (1987) *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 81-87.

Atendiendo a esta clasificación, las lipasas presentan poca actividad en disolventes con bajo log P ($\log P < 2$). Por otro lado, la actividad catalítica es difícil de prever con disolventes de polaridad moderada $2 < \log P < 4$. Y finalmente los biocatalizadores son más activos con disolventes apolares, $\log P > 4$.

Por todo ello, tradicionalmente se admite que los disolventes a emplear en procesos en condiciones microacuosas han de tener alta hidrofobicidad ($\log P > 4$)¹³ a fin de no alterar dicha estructura. Esta visión está basada, única y exclusivamente en la capacidad de los disolventes de $\log P < 2$ para secuestrar agua del biocatalizador liofilizado, produciendo una distorsión de la estructura de la proteína o evitando el cambio conformacional necesario para el proceso catalítico por eliminación del agua esencial de la proteína, mientras que los disolventes apolares no afectan a esta capa de agua retenida alrededor de las enzimas. Sin embargo, existen casos descritos en la literatura donde esta explicación falla. Así por ejemplo, la esterificación del ácido 2-(4-isobutilfenil) propiónico funciona mejor en disolventes de $\log P > 4$ para la lipasa de *Candida antarctica*,^{13,14} pero el exceso enantiomérico disminuye cuando aumenta el $\log P$ ¹⁴ y sin embargo, la transesterificación del (*R,S*) 1-fenil etanol con las lipasas de *F. oxysporum* y *Ps. cepacia*, va mejor en éter diisopropílico ($\log P = 2,0$) que en isooctano ($\log P = 4,50$).¹⁵

La dificultad de sistematizar estos resultados nos ha animado a buscar otras teorías para justificarlos, tales como la cinética de sorción del agua por parte del disolvente¹⁶ o la introducción de otros parámetros como la polarizabilidad, carácter ácido o básico del disolvente, etc. Más

¹³ Arroyo, M. y Sinisterra, J.V. (1994) *J.Org. Chem.*, **59**, 4410-7.

¹⁴ Ducret, A.; Trani, M. y Cortie, R. (1998) *Enzyme Microb. Technol.*, **22**, 212-216.

¹⁵ Cárdenas, F. (1999) *Tesis Doctoral*, Universidad Complutense de Madrid.

¹⁶ Van Erp, S.H.M., Kamenskaya, E.O. y Khmelintsky, Y.L. (1991) *Eur. J. Bioch.*, **202**, 379-384.

recientemente Yang y col.¹⁷ han puesto de manifiesto que también debe considerarse el log P de los sustratos y por ello su capacidad de ser solvatados por agua, a la hora de elegir el disolvente y la cantidad de agua a añadir al macroentorno. Así, estudiando la esterificación del glicerol (log P = -3,0) con diversos ácidos y la lipasa *Pseudomona sp* (PS-30), observaron que el log P del disolvente a elegir cambiaba según la naturaleza del agente acilante, variando entre $-0,33 < \log P < 2,8$. En el caso de la triacetina (log P = -0,075) el log P del disolvente debería oscilar estar entre $0,60 < \log P < 1,9$. Si se esterificaba alcohol bencílico (log P = 1,1) con ácido dodecanoico (log P = 4,8), la reacción sólo iba a log P > 2,5. Así pues, cuanto más polar sea el sustrato, más polar ha de ser el medio, para permitir una buena difusión de éste hacia el biocatalizador sólido. Esta consideración también fue anunciada por Goldberg y col.¹⁸ al manifestar la importancia de la polaridad de los sustratos en las reacciones de transesterificación catalizadas por la lipasa de *Candida rugosa*, donde la actividad con nonanol (log P = 2,33) era 48 veces mayor que con heptanol (log P = 1,80) al trabajar con sustratos anhidros. Esto es debido a la capacidad de modificar el reparto de agua entre las fases que componen el sistema.

Todo ello ha hecho que se reconsidere la acción del disolvente, relacionada tradicionalmente con el valor del log P, apareciendo en la bibliografía actual otra serie de parámetros como son la constante dieléctrica¹⁹ (ϵ), el momento dipolar²⁰, el parámetro de

¹⁷ Yang, B.; Kuo, Sh-J; Mariyadi, P. y Parkin, K.L. (1994) *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 577-583.

¹⁸ Goldberg, M.; Thomas, D. y Legoy, M.D. (1990) *Eur. J. Biochem.*, **190**, 603-609.

¹⁹ Fitzpatrick, P.A.; Klibanov, A.M. (1991) *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 3166-3171.

²⁰ Bornscheuer, U.; Herar, A.; Kreye, L.; Wendel, V. y Capewell, A. et al. (1993) *Tetrahedron: Asymmetry*, **4**, 1007-1016.

solubilidad de Hildebrand (δ)^{21,22} la acidez (α), la basicidad (β) o la polarizabilidad (π^*) con los que se intenta correlacionar la actividad y enantioselectividad de las enzimas liofilizadas actuando como catalizadores en medios orgánicos. No obstante, los resultados son muy variables. Así mientras Gubicza y Szakács-Schmidt²³ encuentran que al aumentar log P, la actividad enzimática aumenta y la enantioselectividad disminuye en la esterificación de ácidos (*R,S*) 2-X-propanoicos (X = Cl, CH₃); Kawashiro y col.²⁴ encuentran una débil correlación inversa entre la enantioselectividad y log P creciente en la transesterificación del ester 2,2,2-trifluoro etílico de la N-fluoroacetil-DL-fenilalanina con n-propanol.

Por otro lado, Arroyo y Sinisterra,²⁵ han demostrado que estos fenómenos se deben a la diferente solvatación de ambos estereoisómeros del sustrato por parte del disolvente. Esto afecta a su liberación y por ello cambia la enantioselectividad y la relación V_{\max}^S/V_{\max}^R como ya indicaban Wolff y col.²⁶ de manera empírica. Estos autores después de estudiar distintos disolventes y distintas propiedades no encontraron una regla homogénea para todos los disolventes.

Lo cierto es que trabajando con la misma enzima se observan diferencias enantioméricas cuando se cambia de disolvente. Así, la lipasa de *Candida rugosa* esterifica el enantiómero *R* (-)

²¹ Hildebrand, J.H.; Prausnitz, J.M. y Scott, R.L. (1970) *Regular and related solutions*. Ed. Van Nostrand Reinhold, New York.

²² Catoni, E.; Cernia, E. y Palacci, C. (1996) *J. Mol. Catal. A: Chemical*, **105**, 79-86.

²³ Gubicza, L. Y Szakács-Schmidt, A. (1994) *Biocatalysis*, **9**, 131-143.

²⁴ Kawashiro, K.; Sugahara, H.; Sugiyama, Sh. y Hayashi, H. (1995) *Biotechnol. Lett.*, **17**, 1161-6.

²⁵ Arroyo, M. y Sinisterra, J.V. (1995) *Biotechnol. Lett.*, **17**, 525-530.

²⁶ Wolff, A.; Straathof, A.J.J.; Jongejan, J.A. y Heisnen, J.J. (1997) *Biocatalysis & Biotransformations*, **15**, 175-184.

del ácido fenoxipropiónico con butanol en tetracloruro de carbono ($E = 16$) pero en acetona esterifica el enantiómero *S* (+).²⁷

Existen al menos cuatro teorías para explicar los cambios de enantioselectividad en disolventes orgánicos.

1. Las diferencias entre enantiómeros en la solvatación del estado de transición del complejo enzima-sustrato.

En esta línea encontramos los trabajos de Klibanov²⁸ que, empleando el log P de disolventes para estimar las diferencias en la solvatación, encontró una buena correlación con la enantioselectividad, aumentando ésta con disolventes polares. Ke y col.²⁹, a partir del complejo enzima-sustrato estimaron la porción de sustrato unida a la enzima y calcularon el coeficiente de actividad de este fragmento. Esta aproximación predice la enantioselectividad en medio orgánico, pero sólo cuando se trabaja con proteasas cristalinas. Parida y Dordick,³⁰ al estudiar la esterificación catalizada por la lipasa de *Candida rugosa* de 2-hidroxiácidos comprobaron un aumento de la enantioselectividad con disolventes poco polares. Carrea y col.²⁷ no encontraron ninguna relación de la enantioselectividad con el log P en la acilación de algunos alcoholes secundarios catalizada por la lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

2. La presencia de moléculas de disolvente unidas al centro activo de la enzima.³¹

²⁷ Carrea, G.; Ottolina, G. y Riva, S. (1995) *Trends Biotechnol.*, **13**, 63-70.

²⁸ Rubio, E.; Fernández-Mayorales, A. y Klibanov, A.M. (1991) *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 695-696.

²⁹ Ke, T.; Wescott, C.R. y Klibanov, A.M. (1996) *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 3366-3374.

³⁰ Parida, S. y Dordick, J.S. (1991) *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 2253-2259.

²⁷ Carrea, G.; Ottolina, G. y Riva, S. (1995) *Trends Biotechnol.*, **13**, 63-70.

³¹ Hirose, Y.; Kariya, K.; Sasaki, I.; Kurono, Y.; Ebiike, H. y Achiwa, K. (1992) *Tetrahedron Lett.*, **33**, 7157-7160.

Siguiendo este enfoque, Ottolina y col.³² han comprobado que los disolventes enantioméricos forman diferentes complejos con la enzima. Así la lipasa de *Candida rugosa* aumentaba su actividad con *R*-carvona vs *S*-carvona hasta un factor de 8. En contraposición, con estos dos disolventes quirales y en presencia de alcoholes secundarios, la enantioselectividad de la lipasa B de *Candida antarctica* en la esterificación de un ácido carboxílico (ácido (*R,S*) 2-(3'-benzoil)fenil propanoico) no se vió afectada tal y como mostraron Arroyo y Sinisterra.²⁵

3. Existe otra teoría en la que se sugiere que los cambios de enantioselectividad se deben a errores cometidos al hacer la medida y a los cambios de solvatación del sustrato. Van Tol y col.³³ comprobaron que al medir la enantioselectividad a tiempo final se producen errores en el caso de que el producto inhiba la reacción. Estos autores, tras la corrección de la inhibición y de la actividad termodinámica de los sustratos, observaron que la acilación del glicidol con vinil butirato catalizada por la PPL no se alteraba al emplear como medios orgánicos disolventes de diferente polaridad.

4. Esta teoría se basa en el estudio realizado por Broos y col.³⁴ que relacionaron el aumento de la enantioselectividad de la subtilisina en diferentes disolventes con el incremento de la flexibilidad del centro activo de la enzima en una escala de nanosegundos. Sin embargo, esta correlación no ha sido estudiada aún con lipasas.

Por último, otro factor a considerar es la influencia de la temperatura en estas

³² Ottolina, G.; Bovara, R.; Riva, S. y Carrea, G. (1994) *Biotechnol. Lett.*, **16**, 923-928.

²⁵ Arroyo, M. y Sinisterra, J.V. (1995) *Biotechnol. Lett.*, **17**, 525-530.

³³ Van Tol, J.B.A.; Jongejan, J.A. y Duine, J.A. (1995) *Biocatal. Biotransform.*, **12**, 119-136.

³⁴ Bross, J.; Visser, A.J.W.G.; Engbersen, J.; Verboom, W.; van Hoek, A. y Reinhoudt, D. (1995) *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 12657-12663.

condiciones. Es evidente que la temperatura afecta al proceso al influir sobre la constante cinética del mismo. No obstante, también puede afectar a la selectividad del proceso al modificar la solvatación de los sustratos en el medio de reacción.³⁵ En esta línea, el trabajo de Adlercreutz y col.³⁶ sobre síntesis de péptidos a bajas temperaturas en condiciones cinéticamente controladas ha marcado el inicio de una nueva metodología de trabajo. En dicho trabajo se describe una mayor selectividad hacia la formación de péptidos con respecto a la hidrólisis del ester, al disminuir la temperatura por debajo de 0 °C. Esto se atribuye a que al bajar la temperatura, los productos orgánicos se vuelven mucho más insolubles en el medio que el agua. La consecuencia inmediata de este hecho es que las reacciones indeseables debidas al agua (en este caso, la hidrólisis del donador de acilo) se minimizan, produciéndose la aminólisis del complejo acil-enzima.

En la misma línea de estudio, Sakai y col.³⁷ aumentaron la enantioselectividad de la acilación catalizada por la lipasa de *Ps. cepacia* en éter dietílico desde E = 17 a 30 °C hasta E = 84 - 99 a -40 °C. En contraposición, la enantioselectividad de la lipasa de *C. rugosa* con ácido 2-fenoxi propanoico aumentó desde E = 5 a 10 °C hasta E = 33 a 57 °C.

³⁵ Wescott, C.R. y Klibanov, A.M. (1993) *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 1629-31.

³⁶ Jönsson, A.; Wehtje, E. y Adlercreutz, P. (1997) *Biotechnol. Lett.*, **9**, 85-88.

³⁷ Sakai, T.; Kawabata, I.; Kishimoto, T.; Ema, T. y Utaka, M. (1997) *J. Org. Chem.*, **62**, 4906-4907.

1.2. Análisis del proceso catalítico empleando lipasas liofilizadas y medios orgánicos débilmente hidratados.

Como se puede deducir de lo anteriormente expuesto, nos encontramos ante un fenómeno muy complejo, con muchas variables interrelacionadas que hacen muy difícil un estudio sistemático de todas y cada una de ellas por separado.

Creemos que el estudio que mejor ha permitido ver cómo ocurre una reacción de esterificación, como por ejemplo la síntesis de octanoato de octilo y una de hidrólisis y hidrólisis de trioleína en medios orgánicos débilmente hidratados es el publicado por el grupo de Vulfson y col.³⁸ aplicando la técnica de microscopía láser de barrido. Esta técnica muestra, empleando naranja de acridina (soluble en agua e insoluble en medio orgánico), cómo al principio de la reacción de esterificación la escasa agua existente en el medio está alrededor de la enzima sólida (Lipozyme IM-60, lipasa de *Rh. mihei* inmovilizada sobre resina aniónica) pero no de forma homogénea, para ir creciendo en volumen alrededor de la enzima sólida. Esto nos indica que al principio de la reacción de esterificación el agua presente está unida al biocatalizador sólido formando una capa de agua mínima,⁵ que actúa a modo de escudo y que a medida que la reacción progresa, se crea un macroentorno hidratado que dificulta el proceso de esterificación.

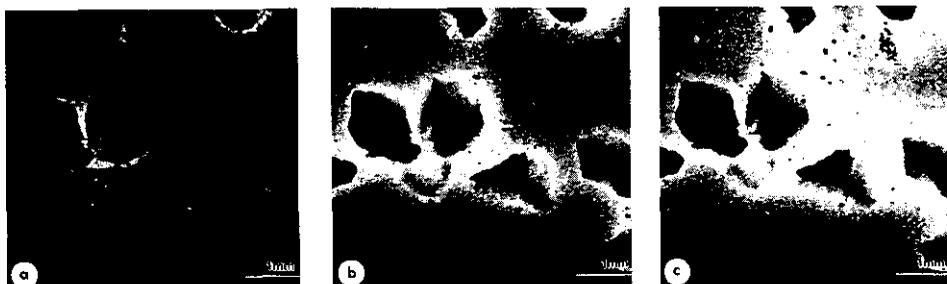
No obstante, el agua tiende a formar macrogotas, por razones termodinámicamente evidentes, abandonando el macroentorno del catalizador, el cual puede seguir actuando sin alcanzar nunca un nivel de macrohidratación que haga imposible termodinámicamente la

³⁸ Stenning, R.A.; Needs, E.C.; Brooker, B.E. y Vulfson, E.N. (1993) *Biotechnology*, **11**, 1294-1301.

⁵ Klibanov, A.M. (1989) *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 141-144.

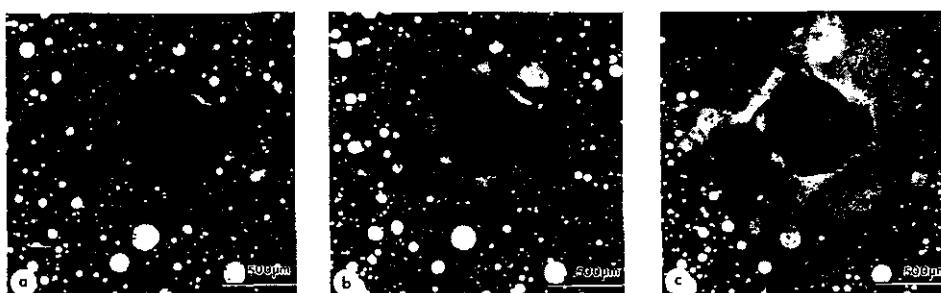
reacción de esterificación.

Figura I.1. Microfotografías a tiempos crecientes del curso de la reacción del ácido octanoico con octanol, empleando un reactivo fluorescente soluble en agua. (a) 5 minutos después de iniciada la reacción, (b) 20, (c) 40 min.³⁸



En el caso de la hidrólisis de la trioleína, los autores observan al principio cómo las microgotas de agua se dirigen hacia la superficie del catalizador sólido, donde tiene lugar la hidrólisis liberando los ácidos grasos que van al medio dado su carácter hidrófobo, mientras se va formando una cápsula de emulsión acuosa alrededor del sólido estabilizada por el glicerol que se va formando. De esta manera se forma la interfase estable *agua-glicerol (enzima)/trioleína*, lo que hace que la hidrólisis se lleve a cabo hasta consumir el triglicérido.

Figura I.2. Microfotografías a tiempos crecientes del curso de la hidrólisis de la trioleína, empleando un reactivo fluorescente soluble en agua. (a) 5 min después de iniciarse la reacción, (b) 15, (c) 25 min.³⁸



Así pues, si queremos entender el funcionamiento de las lipasas liofilizadas (sólido) en medios orgánicos débilmente hidratados debemos analizar qué ocurre en el microentorno de esas

³⁸ Stenning, R.A.; Needs, E.C.; Brooker, B.E. y Vulfson, E.N. (1993) *Biotechnology*, 11, 1294-1301.

partículas débilmente hidratadas, donde el escudo de agua⁵ rodea las partes más hidrófilas del sólido.

1.3. Influencia del método de preparación del catalizador sólido en su actividad/enantioselectividad.

Una cuestión importante es conocer la conformación de la proteína en el sólido liofilizado y si está afectada por el método de preparación del biocatalizador. Estos puntos han sido estudiados en profundidad por el grupo Klibanov³⁹ para el caso de la subtilisina Carlsberg (proteasa alcalina aislada de *Bacillus lichtriformes* EC 3.4.21.14). Esta enzima fue preparada por los autores de nueve formas diferentes:

- 1) Liófilo dializado en tampón fosfato 20 mM, pH = 7,8 (t = 48 h).
- 2) Liófilo dializado en una solución acuosa pH = 7,8 en ausencia de tampón (t = 48 h).
- 3) Enzima en polvo, obtenida por evaporación de la solución tampón.
- 4) Subtilisina precipitada en acetona en exceso.
- 5) Subtilisina preparada en isopropanol.
- 6) Subtilisina con polietilenglicol (Pm = 10.000) liofilizada en tampón fosfato (t = 48 h).
- 7) Subtilisina liofilizada en tampón fosfato que contenía N-acetil-L-fenilalaninamida (t=48 h).
- 8) Cristales de subtilisina unidos vía glutaraldehído.
- 9) Subtilisina modificada covalentemente con polietilenglicol. Esta enzima es soluble en

⁵ Klibanov, A.M. (1989) *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 141-144.

³⁹ Noritomi, H.; Almarsson, O.; Barletta, G. y Klibanov, A.M. (1996) *Biotechnol. Bioeng.*, **51**, 95-99.

medios orgánicos y utilizada como referencia en catálisis homogénea.

Estos preparados se utilizaron como catalizadores de transesterificación de butirato de vinilo (200 mM) con *R* ó *S* 1-feniletanol (150 mM) en dioxano, obteniéndose distintas enantioselectividades (Tabla I.1).

Tabla I.1. Enantioselectividades de varias preparaciones de subtilisina Carlsberg en la transesterificación en dioxano de butirato de vinilo con *R* ó *S* 1-fenil etanol.³⁹

Preparado enzimático	$(K_{cat}/K_m)_S/(K_{cat}/K_m)_R$	
	7 °C	45 °C
1	16	25
2	27	29
3	23	23
4	32	26
5	36	21
6	19	23
7	21	20
8	15	22
9	34	34

Puede apreciarse que la enantioselectividad del biocatalizador depende de la forma de preparación del catalizador sólido, variando ésta con la temperatura. Esto no ocurre con la enzima soluble (muestra 9).

Los autores generalizan el estudio con la lipasa de *Rh. miehei*, utilizada como biocatalizador en la misma reacción observando que la enzima precipitada en isopropanol era más enantioselectiva que la obtenida a partir de la enzima liofilizada en tampón fosfato pH = 7.

Además observaron que la enantioselectividad de estos preparados varía con el disolvente

³⁹ Noritomi, H.; Almarsson, O.; Barletta, G. y Klivanov, A.M. (1996) *Biotechnol. Bioeng.*, **51**, 95-99.

empleado y la temperatura (Tabla I.2).

Tabla I.2. Variación de la enantioselectividad de la lipasa de *Rh. miehei* en la transesterificación de butirato de vinilo con *R* ó *S* 1- feniletanol en varios disolventes anhidros.³⁹

Disolvente	$(K_{cat}/K_m)_S/(K_{cat}/K_m)_R$	
	7 °C	45 °C
Dioxano	170	19
Trietilamina	150	170
Tetrahidrofurano	19	16
Piridina	1,2	1,1
Nitrometano	330	67
Acetonitrilo	150	37

Podemos observar que la enantioselectividad baja al aumentar la temperatura cuando se emplea dioxano, nitrometano o acetonitrilo como disolventes, y se mantiene constante y no varía en piridina, donde el preparado muestra baja enantioselectividad. Por último, en el caso de disolventes como trietilamina o tetrahidrofurano, el efecto es despreciable.

Todo ello, conduce a plantearse que las enzimas liofilizadas no deberían tener la misma conformación y que ésta dependió de la preparación del biocatalizador. Para confirmarlo Klibanov y col.¹⁰ acudieron a la espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) que ya había sido utilizada por Prestrelski y col.⁴⁰ para el estudio de proteínas en fase sólida.

Griebenow y Klibanov⁴¹ describen cómo las bandas de la zona amida correspondientes a la estructura de α -hélice, hojas β y "randon-coil" son diferentes en estado sólido y en

³⁹ Noritomi, H.; Almarsson, O.; Barletta, G. y Klibanov, A.M. (1996) *Biotechnol. Bioeng.*, **51**, 95-99.

¹⁰ Mishra, P.; Griebenow, K. y Klibanov, A.M. (1996) *Biotechnol. Bioeng.* **52**, 609-614.

⁴⁰ a) Prestrelski, S.J.; Arakawa, T.; Carpenter, J.F. (1993) *Archiv. Biochem. Biophys.*, **303**, 465-473.

b) Prestrelski, S.J.; Tedeschi, N.; Arakawa, T.; Carpenter, J.F. (1993) *Biophys.*, **65**, 661-67.

⁴¹ Griebenow, K. y Klibanov, A. (1997) *Biotechnol. Bioeng.*, **53**, 351-362.

disolución. La intensidad relativa de las diferentes componentes de las absorbancias de la banda III de las amidas ($1220-1300\text{ cm}^{-1}$) nos permiten conocer el porcentaje relativo de las tres estructuras (Tabla I.3.).

Tabla I.3. Estructura de la subtilisina Carlsberg determinada por FTIR.⁴¹

Método de preparación	α -hélice (%)	Hoja- β
Solución en agua ^a	30	19
1	23	33
2	22	33
3	28	25
4	19	36
Rayos X-cristal	33	14

^a Tampón fosfato pH = 7,8.

De estos datos podemos ver que mientras la enzima en solución y el monocristal presentan valores semejantes, la liofilización produce (en todos los casos) una disminución del porcentaje de α -hélice y un aumento de las hojas- β . Así pues, las enzimas liofilizadas pueden ser que presenten distinta actividad en medios orgánicos porque su conformación es diferente de la que tienen en fase líquida o cristalizada.

Cuando estos mismos estudios se repitieron con la enzima sólida suspendida en disolventes orgánicos,⁴¹ se obtuvieron resultados interesantes (Tabla I.4).

Podemos ver cómo la liofilización aumenta el % de hoja- β pero este porcentaje varía de forma muy apreciable según el medio. En general, el porcentaje de α -hélice se mantiene constante salvo para el DMSO (dimetilsulfóxido) donde hay desnaturalización de la proteína (incluso sólida). Por el contrario, el porcentaje de hoja- β varía ampliamente. No obstante, vemos que no hay correlación entre los porcentajes relativos de hélice- α y hoja- β y la actividad catalítica en los

distintos medios.

Tabla 1.4. Estructura secundaria de la subtilisina Carlsberg en solución acuosa y suspendida en medios orgánicos.⁴¹

Enzima/disolvente	FTIR		V/K _m ·10 ⁶ (min ⁻¹) ^a
	α-hélice (%)	Hoja-β	
Solución acuosa ^b	34	15	
Liofilizada de 48 h ^c	26	29	
Liofilizada suspendida en:			
Octano	28	26	2000
Hexano	22	28	
Tetracloruro de carbono	21	35	340
Dibutil éter	28	26	240
Tolueno	26	39	150
Alcohol t-amílico	30	41	2100
Dietil éter	26	26	97
Tetrahidrofurano	27	35	120
Acetonitrilo	27	34	150
Dioxano	26	29	9,2
Dimetilsulfóxido	3	12	< 0,1

^a Alcoholisis del ester etílico de la N-acetil-L-alamida con n-propanol.

^b Tampón fosfato 20 mM, pH = 7,8.

^c Procedente de tampón fosfato 20 mM, pH = 7,8.

Así pues, estos autores concluyen que:

i) la liofilización afecta a la estructura de la proteína. En general, baja el porcentaje de α-hélice y sube el de la hoja-β,

ii) aunque los disolventes afectan la proporción relativa de α-hélice y de hoja-β, su variación no parece justificar la variación de actividad observada en esta reacción de esterificación.

⁴¹ Griebenow, K. y Klivanov, A. (1997) *Biotechnol. Bioeng.*, **53**, 351-362.

1.4. Interacción enzima sólida-disolvente orgánico.

Como hemos visto, la enzima liofilizada cambia su conformación al estar en contacto con un medio orgánico en el que no es soluble; pero la cuestión es conocer el mecanismo por el que este hecho tiene lugar.

Del trabajo de Vulfson y col.³⁸ se dedujo que una partícula sólida de enzima liofilizada añadida a un disolvente orgánico inmisible con agua, entra en contacto directo con el disolvente orgánico el cual debe interaccionar con las moléculas de proteína liofilizada para crear los cambios conformacionales descritos por Klibanov y col.^{39,10,41} Ello produce una alteración de los enlaces amido y de los enlaces de hidrógeno que mantienen la estructura de la proteína tal y como han demostrado Combes y col.⁴² Por otro lado, disolventes hidrófobos interaccionan con las zonas hidrófobas de la proteína provocando también alteraciones estructurales. Todos ellos pueden ser seguidos por las variaciones en la posición relativa de las bandas I y III de amidas.

Por último y no menos importante está la capacidad de eliminar el agua unida al sólido liofilizado provocando la desactivación de la proteína.

No obstante, no existe un patrón de acción pues como puede suponerse todo depende de la estructura de la proteína y del disolvente orgánico. Es por ello por lo que Klivanov y col.⁴¹ no obtienen valores correlacionables entre la estructura (% de α -hélice, láminas- β , etc.) y la actividad

³⁸ Stenning, R.A.; Needs, E.C.; Brooker, B.E. y Vulfson, E.N. (1993) *Biotechnology*, **11**, 1294-1301.

³⁹ Noritomi, H.; Almarsson, O.; Barletta, G. y Klibanov, A.M. (1996) *Biotechnol. Bioeng.*, **51**, 95-99.

¹⁰ Mishra, P.; Griebenow, K. y Klibanov, A.M. (1996) *Biotechnol. Bioeng.*, **52**, 609-614.

⁴¹ Griebenow, K. y Klibanov, A. (1997) *Biotechnol. Bioeng.*, **53**, 351-362.

⁴² Combes, D.; Auzanneu, I. y Zwick, A. (1993) *Stability & Stabilization of Enzymes*, pag.: 29-36. Eds.: Vanden Tweel, W.J.J.; Harder, A. y Buitelaar, R.M., Elsevier Science Pub. The Netherlands.

del sólido en medios orgánicos.

1.5. Importancia del agua del microentorno del catalizador sólido.

En la introducción a esta Sección comentamos basándonos en el trabajo de Vulfson y col.³⁸ cómo variaba la distribución del agua alrededor del biocatalizador sólido en procesos de esterificación o hidrólisis en medios orgánicos débilmente hidratados. Su papel es crucial en estos procesos ya que puede controlar, dependiendo de la enzima, la conversión,⁴³ la enantioselectividad del proceso²⁴ o la estabilidad térmica del biocatalizador.⁴⁴

Su importancia ha hecho que se desarrollen diversas metodologías que intentan determinar la cantidad de agua unida al biocatalizador y la naturaleza de esta unión. Vamos seguidamente a comentar algunos de las principales metodologías, que también hemos utilizado en esta Memoria.

³⁸ Stenning, R.A.; Needs, E.C.; Brooker, B.E. y Vulfson, E.N. (1993) *Biotechnology*, **11**, 1294-1301.

⁴³ Yahya, A.R.M.; Anderson, W.A. y Moo-Young, M. (1998) *Enzyme Microb. Technol.*, **23**, 438-450.

²⁴ Kawashiro, K.; Sugahara, H.; Sugiyama, S. y Hayashi, H. (1995) *Biotechnol. Lett.*, **17**, 1161-1166.

⁴⁴ Pirozzi, D.; Toscano, G. y Greco Jr., G. (1997) *Biocatalysis & Biotransformations*, **14**, 285-297.

1.5.1. Aplicación de la RMN-¹H a la determinación de agua unida a la proteína.

Aplicación de la RMN a la determinación del agua de hidratación de enzimas en estado nativo.

La RMN-¹H empleando la metodología de la relajación magnética permite analizar la estructura y la dinámica del agua en el macroentorno de la proteína. Esta metodología permite estudiar:

- i) el intercambio de H⁺ entre el agua del microentorno y los grupos OH, SH y NH de la proteína,
- ii) el intercambio de moléculas de agua entre sitios específicos de la proteína,
- iii) el número y frecuencia de las colisiones entre moléculas de agua y la proteína.

Esta información se deduce de las velocidades de relajación de los H⁺ del agua, que son diferentes según sea el microentorno del núcleo observado. De todas las moléculas de agua que están en contacto con la proteína, algunas permanecen unidas suficiente tiempo a ésta como para que tenga lugar una transferencia de magnetización efectiva entre el protón del agua y los de la proteína a través de una relajación dipolar intermolecular. Esto provoca un descenso en el tiempo de relajación y un aumento en la velocidad de relajación de los protones del agua alcanzándose tiempos de vida media de 1 segundo para algunas moléculas de agua en la proteína. Esto no ocurre en el resto de las moléculas de agua no asociadas a estos sitios de alta afinidad de la proteína. En estos casos el intercambio con el solvente es mucho más rápido en la escala de picosegundos. Así pues podemos determinar, en principio, el número de moléculas de agua que interaccionan con la proteína durante el período de adquisición de la resonancia magnética, lo que nos pueden dar una idea de las propiedades superficiales de la misma.

Estos estudios se han de realizar con un aparato de RMN con *transformada de Fourier* para descodificar la señal. Entre las ventajas del empleo de la transformada de Fourier podemos encontrar:

- la ausencia de rendijas para atenuar la radiación, por tanto, la potencia de la radiación es mayor y la relación señal/ruido es muy superior,

- todas las señales llegan al detector a la vez, esto permite obtener un espectro completo en un breve período de tiempo.

Un espectro obtenido experimentalmente está compuesto de un número de medidas individuales. La calidad del espectro aumenta con un mayor número de medidas o cuando los intervalos de frecuencias entre medidas disminuyen; sin embargo, esto conlleva un aumento del tiempo necesario para obtener el espectro. Con el empleo de la transformada de Fourier todas las señales se miden simultáneamente reduciendo el tiempo necesario para obtener un espectro para cualquier señal/ruido dada.

En estos aparatos la muestra se mantiene en un campo magnético con una fuerza de varios teslas. La muestra se irradia periódicamente con pulsos de radiofrecuencia, los cuales atraviesan la muestra perpendicularmente al campo. El tamaño de los pulsos es generalmente $< 10 \mu\text{s}$, siendo el intervalo entre impulsos, T , de aproximadamente uno a varios segundos. Durante el tiempo T , los núcleos vuelven al estado original emitiendo una señal de radiofrecuencia de dominio de tiempo, llamada *señal de caída de libre inducción* (FID), que se detecta con una bobina radorreceptora colocada perpendicularmente al campo magnético estático. La FID se digitaliza y se almacena en un ordenador para el procesamiento de los datos. Normalmente las señales de caída de *dominio de tiempo* (variaciones de la potencia de la radiación con el tiempo), de numerosos impulsos sucesivos se suman para mejorar la relación señal/ruido; la resultante se

convierte a una señal de *dominio de frecuencia* (representa las variaciones de la potencia radiante en función de la frecuencia) mediante una transformación de Fourier.⁴⁵

La absorción de energía se produce por los núcleos que están en el estado de menor energía (estado paralelo) saltando al estado de mayor energía (estado antiparalelo). Si el proceso de absorción de energía iguala el número de núcleos en los dos estados, la señal de absorción disminuye hasta ser cero y se dice que el sistema de espín está *saturado*. Para evitar la saturación del sistema la velocidad de relajación de los núcleos excitados a sus estados de menor energía debe ser mayor o igual a la velocidad de absorción de los fotones de radiofrecuencia por parte de los núcleos del estado de menor energía. Por eso en procesos de RMN es importante la relajación no radiante que disipa energía con los átomos del entorno del núcleo. Interesa además que el tiempo de vida del estado excitado sea pequeño para que no se sature el sistema, ya que si es así hay un ensanchamiento de la línea y la resolución de las medidas disminuye. El tiempo óptimo de una especie excitada está comprendido entre 0,1 a 1 s.

Hay dos tipos de relajación:

- a) relajación longitudinal o espín-red.
- b) relajación transversal o espín-espín.

a) *Relajación longitudinal o espín-red.*

La red está formada por el conjunto de los núcleos de átomos que constituyen una muestra. Sobre todo en líquidos y en gases los núcleos de la red se mantienen en continuo movimiento vibratorio y rotatorio originando un campo complejo alrededor de cada núcleo

⁴⁵ Skoog, D. y Leary, J. *Análisis instrumental*, pág. 370. McGraw-Hill. Interamericana S.A.

magnético. El campo de red que resulta, contiene componentes magnéticas en las tres direcciones del espacio cartesiano que hacen que los núcleos pasen del estado de espín más alto al más bajo, de modo que la energía absorbida por la red aumenta la amplitud de las vibraciones o rotaciones térmicas de los átomos de la red. Este cambio se corresponde con un ligero aumento de la temperatura de la muestra. La relajación espín-red se caracteriza por un tiempo de relajación T_1 , que es una media promedio del tiempo de relajación de los núcleos en el estado superior de energía. T_1 depende, entre otros factores, de la relación giromagnética de los núcleos que absorben la energía y del tiempo de correlación rotacional del núcleo observado. El tiempo de correlación mide el tiempo que tarda un núcleo en volver a sus coordenadas originales. Cuando la movilidad es baja, como en sólidos y líquidos viscosos, los tiempos de correlación son largos y T_1 es corto. Cuando la movilidad aumenta, los tiempos de correlación rotacional disminuyen y T_1 es largo.

T_1 disminuye en presencia de átomos con un electrón desapareado, que debido a su espín, crea un intenso campo magnético fluctuante. También ocurre esto con núcleos con espín $> \frac{1}{2}$, donde la distribución de la carga no es simétrica y la rotación provoca un intenso campo fluctuante que abre otra vía para que el núcleo excitado ceda su energía a la red. La disminución de T_1 provoca un ensanchamiento de la línea de RMN- ^1H .

b) *Relajación espín-espín.*

Otros efectos que disminuyen los tiempos de relajación y también provocan un ensanchamiento de la línea, se agrupan como T_2 o tiempo de relajación transversal o espín-espín.

Esta relajación tiene lugar por la interacción entre núcleos vecinos que tienen la misma velocidad de precesión pero un estado cuántico magnético distinto. La interacción provoca

intercambio de estados cuánticos entre núcleos: los núcleos con menor estado de espín se excitan y los núcleos excitados se relajan al estado de menor energía. Así no hay cambio en los estados pero el tiempo de vida promedio de un núcleo excitado en particular se acorta. El resultado es el ensanchamiento de la línea, que también puede ser provocado por otras causas. Una de las causas de esta variación en el campo estático es la presencia en la muestra de otros núcleos magnéticos, cuyos espines originen campos locales que pueden aumentar o disminuir el campo magnético externo que actúa sobre el núcleo de interés. En una red con movilidad, estos campos locales tienden a anularse debido a los movimientos de los núcleos que los producen. Pero en sólidos o en líquidos viscosos los campos locales pueden persistir como para producir una variedad de campos de fuerza y por tanto una gama de frecuencias de absorción. También hay variaciones en el campo estático por pequeñas heterogeneidades en la propia fuente del campo. Este efecto se puede contrarrestar en parte girando la muestra en el campo magnético.

En el caso concreto que nos ocupa, la velocidad de relajación espín-red de los protones del agua depende del campo magnético y de la temperatura y provoca que el movimiento en función del tiempo de una molécula de agua en contacto con una proteína sea inferior al del agua pura a temperatura ambiente. Por ello, el estudio de la relajación espín-red permite estudiar la dinámica molecular de las moléculas de agua que rodean a la proteína.

También se pueden detectar en espectros de alta resolución moléculas de agua unidas a la proteína aprovechando que su unión a proteínas hace que posean tiempos de vida medios relativamente largos al ser muy importante la relajación vía acoplamiento dipolar agua-proteína. Esto se basa en el hecho de que el acoplamiento magnético agua-proteína afecta a la velocidad de relajación del agua en estos sistemas heterogéneos. La información obtenida con esta técnica dinámica no está en contradicción con la suministrada por las técnicas estáticas como la

difracción de rayos-X, que determinan el número de moléculas unidas fuertemente a la proteína cristalizada, sino que debe considerarse como complementaria.

Aplicación de la RMN a la determinación del agua de hidratación de enzimas liofilizadas suspendidas en medios orgánicos.

Como indicaron Zaks y Klivanov^{3,46} el disolvente compite con la enzima sólida por el agua disponible (micro y macroentorno). Ello justifica la baja reactividad observada cuando se usan enzimas liofilizadas en medios orgánicos hidrófilos ya que éstos atrapan el agua del biocatalizador sólido produciendo su desactivación. Para medir este fenómeno se han empleado diversas metodologías. La primera fue la valoración Karl-Fisher del agua del macroentorno y determinando por diferencia el agua del microentorno^{47,48}. No obstante, este medio no es útil para el caso de disolventes relativamente hidrófobos o muy hidrófobos.

El intercambio de ^3_1H entre la proteína tratada previamente con $(^3_1\text{H})_2\text{O}$ y el disolvente, ha sido descrito por Gorman y Dordick⁴⁸. No obstante la técnica de trabajo con isótopos radioactivos no está al alcance de todos los laboratorios.

Más recientemente Parker y col.⁴⁹ han demostrado que el empleo del RMN- ^2H es una técnica muy sensible para medir el grado de hidratación de la proteína. Para ello la proteína se equilibra en $(^2_1\text{H})_2\text{O}$ y se pone en contacto con n-propanol. Seguidamente se determina el grado

³ Zaks, A.; Klivanov, A.M. (1984) *Science*, **224**, 1249-1251.

⁴⁶ Zaks, A.; Klivanov, A.M.(1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 8017-8021.

⁴⁷ McMinn, J.H.; Sowa, M.J.; Chanick, S.B.; Paulaitis, M.E. (1993) *Biopolymers*, **33**, 1213-1224.

⁴⁸ Gorman, L.A.S. y Dordick, J.S. (1992) *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 392-7.

⁴⁹ Parker, M.C.; Moore, B.D. y Blacker, A.J. (1995) *Biotechnol. Bioeng.*, **46**, 452-458.

de enriquecimiento en deuterio de la banda OH del alcohol y así se calcula el grado de hidratación de la muestra sólida.

La técnica de RMN también se ha aplicado al estudio del intercambio de moléculas cuando la reacción transcurre en medio bifásico.⁵⁰ El estudio se basa en comparar el área de la señal de los H⁺ hidroxílicos con las curvas obtenidas al equilibrar las muestras a diferentes valores de a_w , aprovechando que existe una linealidad del área analizada con la a_w de la muestra. Mediante un cálculo sencillo la concentración de los H⁺ hidroxílicos obtenida a partir de su área, nos da la concentración de la muestra. De esta manera se pueden obtener isothermas aprovechando la señal RMN-¹H. La aplicación de este método a un sistema bifásico formado por una fase líquida (mezcla equimolecular de ácido + alcohol) y una fase sólida (lipasa) equilibradas por separado a diferentes valores de a_w , informa del intercambio de agua entre ambas fases a lo largo de la reacción. Estos intercambios, que van desde la fase sólida con un alto valor de a_w , hasta la fase líquida con un bajo valor de a_w , se caracterizan por ser lentos.

De la misma manera, Hills y col.⁵¹ han encontrado una relación entre a_w y el tiempo de relajación del agua determinada por RMN.

Otros estudios del comportamiento del agua empleando RMN fueron los realizados por el grupo de Kojima y col.,⁵² que se centraron en determinar la movilidad de las moléculas de agua en soportes como el PEG y en sistemas de agua-gelatina, empleando para ello el tiempo de relajación espín-red (T_1).

⁵⁰ Decagny, B.; Ergan, F.; Sarazin, C.; Barbotin, J. y Seguin, J. (1996) *Anal. Biochem.*, **234**(2), 142-8.

⁵¹ Hills, B.P.; Manning, C.E.; Ridge, Y. y Brocklehurst, T. (1996) *J. Sci. Food Agric.*, **71**(2), 185-194.

⁵² Yoshioka, S.; Aso, Y.; Otsuka, T. y Kojima, S. (1995) *J. Pharm. Sci.*, **84**(9), 1072-7.

1.5.2. Isotermas de sorción de agua. Concepto de a_w .

En los últimos 20 años el uso del concepto de *actividad de agua* para describir el estado del agua en el entorno se ha ido introduciendo y ganado aceptación en el campo de la Microbiología, la Biotecnología y sobre todo en la Industria alimentaria.

Particularmente, en el campo de la Biotecnología y sobre todo en la aplicación de las enzimas a síntesis orgánica, el agua juega un papel muy importante en la estructura y función de las enzimas⁵³:

- actúa en la estructura enzimática al crear enlaces de hidrógeno aminoácido-agua,
- altera la estructura de la proteína al destruir los enlaces de hidrógeno aminoácido-aminoácido,
- facilita o dificulta la difusión de reactivos hacia el centro activo,
- participa en la constante de equilibrio (el agua puede ser sustrato o producto).

La cantidad de agua presente en el medio de reacción afecta a la actividad enzimática, cuando el proceso se lleva a cabo en procesos orgánicos ligeramente hidratados ya que ayuda a mantener la conformación activa mediante interacciones de tipo no covalente: interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals.⁵⁴ Frente a los primeros trabajos sobre el agua, que realizaban un estudio de la variación de la actividad catalítica del biocatalizador con respecto a los mililitros de agua añadidos directamente al medio, y que no condujeron a resultados racionalizables, la moderna bibliografía prefiere hablar de procesos

⁵³ Drajon, R. (1985) *Properties of water in foods*. Eds.: Simaton, D. y Multon, J.L. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. The Netherlands.

⁵⁴ Schulz, G.E. y Schirmer, R.H. (1979) *Principles of protein structure*. Springer-Verlag, New York.

realizados a una determinada actividad de agua del sistema.

Definición del valor de a_w .

Cuando las moléculas de agua están disueltas en agua pura, cada una de ellas se rodea de otras moléculas de agua formando una esfera de hidratación. La entropía disminuye cuando las moléculas de agua están orientadas con respecto a las moléculas de soluto, ya que las moléculas de agua tienen menos libertad para pasar de la fase líquida a la fase de vapor y por tanto la presión de vapor disminuye. Consecuentemente se provoca una disminución del punto de congelación y un aumento del punto de ebullición.

De acuerdo con la Ley de Raoult, al disolver un soluto en agua disminuye la presión de vapor, esta disminución es continua hasta llegar a la saturación de la solución y provocar el inicio de la cristalización. La Ley de Raoult establece que para solutos ideales la presión de vapor relativa del disolvente es igual a la fracción molar del soluto:

$$\frac{(P_o - P)}{P_o} = \frac{n_1}{(n_1 + n_2)} \quad [1]$$

donde:

P = presión de vapor de la solución,

P_o = presión de vapor del disolvente,

n_1 = moles de soluto,

n_2 = moles de disolvente.

Si suponemos un sistema cerrado en el que una fase gaseosa húmeda se encuentra en equilibrio con la fase líquida también húmeda, podemos definir la actividad del agua de la fase

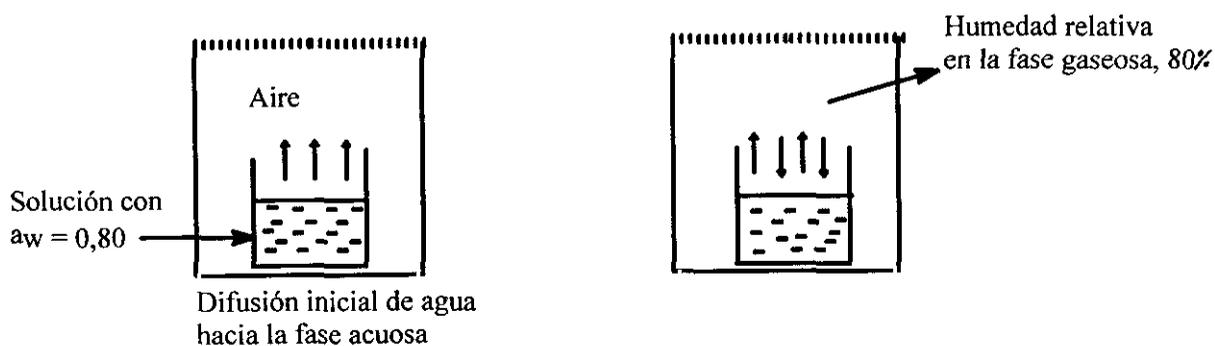
líquida (en nuestro caso una disolución de reactivos o el biocatalizador) a una temperatura dada T, como:

$$a_w = \frac{f_w}{f_w^\circ} \quad [2]$$

donde f_w es la fugacidad del agua en la mezcla a la temperatura de equilibrio, y f_w° es la fugacidad del agua pura a la misma temperatura.

Si la concentración de agua existente en el sistema es pequeña (como ocurre en los procesos biocatalizados en medios orgánicos ligeramente hidratados), se puede suponer que el vapor de agua a esa concentración se comporta como un gas ideal, por lo que podemos sustituir la fugacidad (f_w) por la presión parcial del vapor de agua del sistema a esa temperatura (P_w) y f_w° por la presión del agua pura (que es muy próxima a 1 atmósfera), que coincide con el término de la izquierda de la ecuación que define la Ley de Raoult. Este cociente se denomina también Humedad Relativa en el Equilibrio (H.R.E.) (Ver Esquema I.1) y se suele expresar en tanto por ciento. Así pues tendríamos que:

$$a_w = \frac{P_w}{P_w^\circ} \quad [3]$$

Esquema I.1. Relación entre H.R.E. y a_w .

$$\text{H.R.E.} = \left(\frac{P_w}{1} \right) \times 100 \quad [4]$$

En algunas ocasiones se emplea el concepto de *Coefficiente de actividad* (ϕ) para considerar soluciones reales no diluidas. Los coeficientes de actividad están disponibles en la literatura específica pero se han definido varias ecuaciones empíricas para su cálculo. Recientemente se ha empleado el parámetro a_w y ϕ para soluciones acuosas de electrolitos donde quedaban definidas físico-químicamente las características de estas soluciones.⁵⁵ Y ambos parámetros se han utilizado para evaluar las interacciones con el agua de proteínas presentes en alimentos.⁵⁶

⁵⁵ Miyawaki, O.; Saito, A.; Matsuo, T. y Nakamura, K. (1997) *Biosci. Biochem.*, 61(3), 466-469.

⁵⁶ Kumagai, H.; Seto, H.; Kumagai, H.; Sakurai, H.; Ishii, K. y Arai, S. (1994) *Dev. Food Eng., Proc.Int. Congr. Eng. Food., 6th, 1.* Ed.: Yano, T.; Matsuno, R.; Nakamura, K. Blackie, K. Glasgow (UK).

Unión del agua.

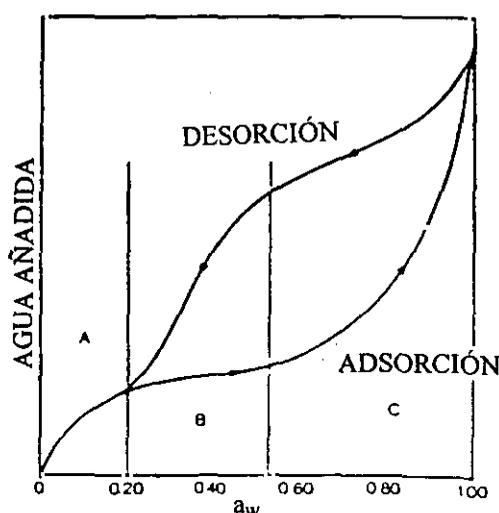
Las interacciones de las moléculas de agua con sitios específicos de las moléculas de soluto desempeñan un importante papel en la unión de las moléculas de agua. Generalmente, para la misma concentración molal, la capacidad para retener agua disminuye en los siguientes compuestos, según el orden expuesto:

- i) compuestos iónicos,
- ii) compuestos no iónicos de bajo peso molecular; por ejemplo, azúcares y péptidos,
- iii) compuestos de alto peso molecular que tienen grupos iónicos; por ejemplo, proteasas,
- iv) compuestos de alto peso molecular que contienen grupos polares; por ejemplo, almidón, pectinas, celulosa.

En el campo de la enzimología hay que tener en cuenta que las interacciones agua-proteína están influenciadas por numerosos factores como: la composición en aminoácidos, la superficie, la polaridad, la carga, la conformación y la topografía de la proteína, el pH, las especies iónicas y la temperatura.

La forma usual de representar estos datos, es una curva que mide la variación de la cantidad de agua añadida frente a a_w . Según que las medidas sean efectuadas en el curso de la deshidratación de la muestra (*desorción*) o en el curso de la rehidratación de la misma (*adsorción* o *resorción*) se obtendrán dos curvas, las cuales no tienen por qué coincidir (fenómeno de *histéresis*) (Figura I.3).

Figura I.3. Isoterma de sorción de agua mostrando el efecto de la histéresis.



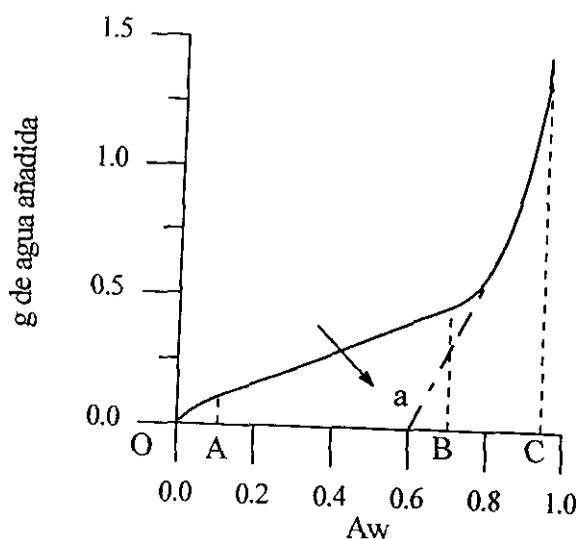
En algunos tramos de la isoterma, para un determinado nivel de a_w , las diferencias son patentes si escogemos la curva de adsorción o la de desorción. Así en el caso de una valor de $a_w = 0,2$ la concentración de agua es la misma, pero si vamos a valores superiores como $a_w = 0,5$ el contenido de agua revelado por una curva u otra es significativamente distinto.

Variando la temperatura se obtiene un conjunto de isotermas de adsorción ya que la afinidad por el agua de los productos disminuye cuando se eleva la temperatura.

La isoterma de absorción podría considerarse que está compuesta por tres zonas características y bien diferenciadas (Figura I.4):

- Región (O-A), corresponde al agua muy fuertemente unida por uniones hidrógeno o agrupamientos polares de la proteína, constituye la primera capa de hidratación.
- Región (A-B), corresponde a una o más capas de agua adicionales, más fácilmente retenidas.
- Región (B-C), que corresponde a la aparición de agua retenida por uniones de débil energía de tipo capilar u osmótico.

Figura I.4. Modelo general de la Isoterma de sorción de agua.



Métodos para la medida de a_w ⁵⁷

1. Interpolación gráfica.

La a_w es por definición el % de humedad relativa de equilibrio a la que una sustancia cualquiera gana o pierde humedad a una temperatura específica. Este principio se puede usar para estimar o interpolar gráficamente la a_w de una muestra. Se determina el peso del agua perdida o ganada en cámaras con diferentes grados de humedad relativa y luego se interpola como % de humedad relativa de equilibrio. El principal inconveniente es la necesidad de algunas cámaras de humedad que imponen unas limitaciones de espacio para laboratorios convencionales.

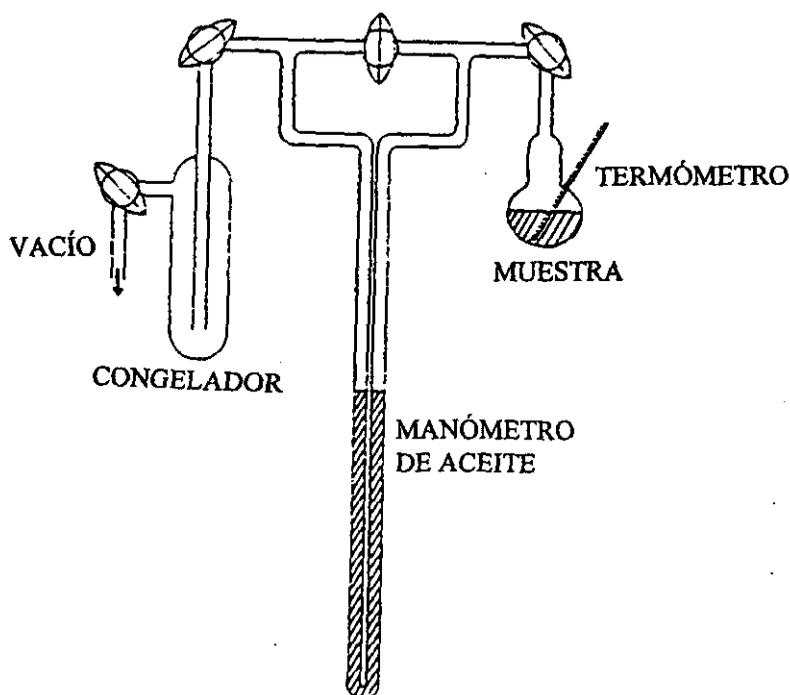
2. Manometría.

La a_w se relaciona con la presión de vapor a una temperatura constante; por tanto, la a_w se mide a través de la presión de vapor. Este método tiene alta precisión y no es caro, pero los

⁵⁷ Jermini, M.F.G. (1986) *Osmotolerant yeasts-Their detection, isolation and properties related to food processing*, ETH-Dissertation, n° 8029.

manómetros son frágiles e incapaces de medir a lo largo de un amplio rango de presión de vapor (Figura I.5).

Figura I.5. Manómetro de presión de vapor.



3. Higrometría capilar.

Este procedimiento está relacionado higroscopicidad del pelo humano y la capacidad de estirarse cuando está hidratado. Es un método barato pero menos sensible que otros instrumentos de medida de a_w .

4. Higrometría eléctrica.

La aplicación de este procedimiento se basa en dos principios:

- i) medida de la resistencia en ohmios con la humedad relativa de una sal higroscópica,
- ii) actúa como un higrómetro eléctrico.

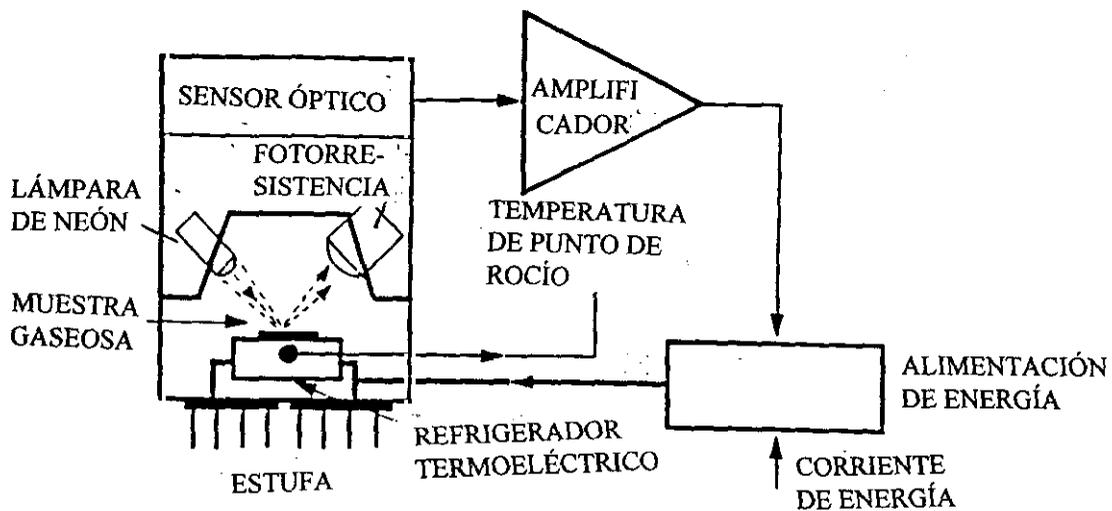
Tiene buena precisión y operabilidad pero requieren una exhaustivas calibración y son caros. Este método fue utilizado por Correa y col.⁵⁸

⁵⁸ Correa, A.; Comesana, J. y Sereno, A. (1994) *Fluid Phase Equilib.*, **98**, 189-99.

5. Método del punto de rocío.

Se puede calcular la a_w midiendo la temperatura exacta a la que se produce la condensación del vapor de agua. El principio básico es que el agua puede ser congelada sin cambios en su contenido hasta el estado de saturación. Presenta una importante precisión, pero la determinación es complicada.

Figura I.6. Diagrama de un instrumento de punto de rocío automatizado.



6. Disminución del punto de congelación.

La determinación de a_w se realiza midiendo la presión del punto de congelación de la solución respecto al agua pura.

Influencia de a_w en procesos químicos, bioquímicos y biológicos.

La a_w puede afectar en la velocidad de reacciones incluidas en este tipo de procesos y en consecuencia alterar la estabilidad de la muestra objeto de estudio:

1. Afecta a la conservación de alimentos a través de procesos de oxidación.
2. Afecta a la estabilidad de alimentos influyendo en el pardeamiento enzimático o reacción de Maillard.

3. Afecta a los nutrientes de alimentos; por ejemplo, la vitamina C es estable a bajos valores de a_w , mientras que la descomposición del ácido ascórbico se produce a altas a_w .

4. Afecta a la actividad bacteriana afectando a procesos de crecimiento, germinación, esporulación y producción de toxinas.

5. Afecta la la fabricación y estabilidad de fármacos, por lo que es un parámetro objeto de control en la Industria farmacéutica.

De los microorganismos asociados con alimentos, los mohos son los más tolerantes a un valor bajo de a_w ; seguidos de las levaduras, que son más tolerantes que las bacterias.⁵⁹

Dentro del campo de la Microbiología la reciente bibliografía describe la relevancia que tiene el parámetro de a_w a la hora de controlar procesos de fermentación, particularmente en el crecimiento de microorganismos y en la producción de enzimas y compuestos procedentes de su metabolismo.

Así nos encontramos que controlando el valor de a_w podemos manipular la formación de micotoxinas como el ácido ciclopiazónico y la aflatoxina en *Aspergillus flavus*.⁶⁰

En el caso de *Lactococcus lactis* trabajando en un rango de altos valores de a_w , se favorece la formación de ácido láctico; pero si el valor de a_w desciende, se forma ácido acético, que colabora en la alteración de las propiedades organolépticas del queso.⁶¹

En el campo de la Industria farmacéutica, recientes trabajos demuestran su influencia en

⁵⁹ Prior, B.A: (1990) *Water activity and microorganisms. Symposium on water activity at Labotec*, Johannesburg, SA.

⁶⁰ Gqaleni, N.; Smith, J.; Lacey, J. y Gettinby, G. (1997) *Appl. Environ. Microbiol.*, **63(3)**, 1048-1053.

⁶¹ Valik, L.; Gorner, F.; Zemenovic, J. (1995) *Protavin Vedy*, **13(5)**, 355-67.

la producción de antibióticos β -lactámicos por *Streptomyces clavuligerus*,⁶² o en la cristalización de la ampicilina⁶³ y de la teofilina.⁶⁴ Se emplea también en la prevención de la contaminación bacteriana, en el área de la Cosmética^{65,66} y principalmente en el campo de la Industria alimentaria.⁶⁷

En enzimología y particularmente en la aplicación de enzimas a síntesis orgánica, el agua desempeña un papel muy importante en la estructura y funciones de la enzima:

- a) actúa sobre la estructura contribuyendo a uniones no covalentes,
- b) puede alterar la estructura proteica desorganizando los enlaces de hidrógeno,
- c) facilita la difusión de reactivos,
- d) participa de la constante de equilibrio, puede ser sustrato o producto.

Para determinar el efecto del agua en un equilibrio se emplea la a_w , que permite describir la distribución del agua entre las fases que forman el sistema y pueden verse afectadas por una unión con las moléculas de agua. También la presencia de disolvente orgánico o especies apolares influyen en el reparto de agua y afectan a la fase polar, donde está presente el biocatalizador. Para poder valorar este efecto, se emplea el log P. Por otro lado, la diferente solvatación de reactivos y productos presentes en el sistema provoca cambios en la concentración afectando a las constantes de equilibrio, al rendimiento de la reacción y a la cinética del biocatalizador.

⁶² Cochet, N. y Demain, A. (1996) *J. Appl. Bacteriol.*, **80**(3), 333-7.

⁶³ Zhu, H. y Grant, D. (1996) *Int. J. Pharm.*, **139**(1,2), 33-43.

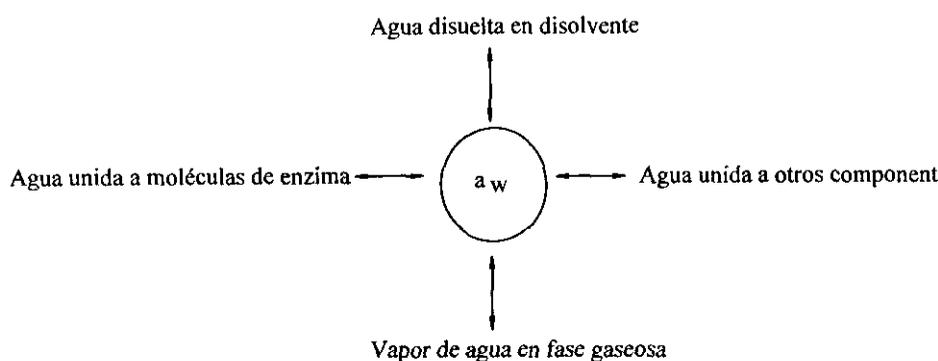
⁶⁴ Zhu, H.; Yuen, C. y Grant, D. (1996) *Int. J. Pharm.*, **135**(1,2), 151-160.

⁶⁵ Enigl, D.C. y Sorrells, K.M. (1997) *Cosmet. Sci. Technol. Ser.*, **16**, 45-73.

⁶⁶ Franke, J. y Meyer, B. (1994) *SOFW J.*, **120**(6), 317-18, 320-1.

⁶⁷ Leistner, L. y Russell, N.J. (1991) *Food Preserver.*, 111-34. Ed.: Russell, N.; Gould, G. Glasgow (UK).

Esquema 1.2. Influencia en el valor de a_w del equilibrio entre el agua libre y el agua unida a varias moléculas o fases.



En una reacción catalizada enzimáticamente la medida de a_w se ha realizado a través de sensores en contacto con una fase de vapor que se mantiene por encima de la mezcla de la reacción orgánica o sobre una muestra sólida.^{68,18,69,70} Esta atmósfera puede contener cantidades de vapor del disolvente u otras especies volátiles que pueden afectar al sensor. Sin embargo, existen otros sensores como el detector de humedad de cloruro de litio, que no se ven afectados por la presencia de disolvente, tal y como lo demuestran los estudios realizados en medios orgánicos que van desde el hexano al etanol.⁷¹ Otros sensores actúan sumergidos en fases orgánicas líquidas, aunque presentan dificultades para su manipulación.⁷² Recientemente se han propuesto otros métodos alternativos como el de Degn y Frigaard⁷³ que describe el uso de una

⁶⁸ Halling, P.J. y Macrae, I. (1982) *Fat Processing. Eur Patent Appl.* **64**, 855.

¹⁸ Goldberg, M.; Thomas, D. y Legoy, M.D. (1990) *Eur. J. Biochem.*, **190**, 603-609.

⁶⁹ Blanco, R.M.; Guisán, J.M. y Halling, P.J. (1989) *Biotechnol. Lett.*, **11**, 811-816.

⁷⁰ Goldberg, M.; Parvaresh, F.; Thomas, D. y Legoy, M.D. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, **957**, 359-362.

⁷¹ Blanco, R.; Rakels, J.; Guisán, J. y Halling, P.J. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1156(1)**, 67-70.

⁷² Khan, S.A.; Halling, P.J. y Bell, G. (1990) *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 453-458.

⁷³ Degn, H. y Frigaard, N.-U. (1993) *Anal. Chim. Acta*, **274(2)**, 355-9.

membrana conectada a una célula con un espectrómetro de masas, o el de Sarazin y col.⁷⁴ que identifica cambios en los desplazamientos químicos en RMN-¹H en protones intercambiables como función de a_w .

En lugar de medir a_w directamente, también puede calcularse a partir de la concentración de agua disuelta en la fase apolar mayoritaria siempre que los cálculos para los coeficientes de actividad se tengan en cuenta. En medio orgánico, esta concentración se mediría por el método de Karl Fisher o alguna de sus variantes.^{46,47,75,76} Sin embargo, no se trata de un método muy preciso, ya que es indirecto y requiere que las muestras sean tomadas y controladas provocando con la manipulación ciertos errores, especialmente en medios poco polares donde las concentraciones de agua son bajas. Como alternativa, también se ha empleado la medida de la radiación provocada por el centelleo del agua titulada.⁴⁸ El inconveniente es que es un método caro y el estudio no se ha aplicado a la determinación de a_w . No obstante, cualquier medida en una muestra, ya sea de concentración de agua o de a_w requiere gran cuidado ante la posibilidad de un cambio durante la manipulación. Es fácil tener pérdidas cuando los niveles de agua son bajos debido a su volatilidad y fácil adsorción a cualquier material. Igualmente el agua se puede adsorber en cualquier muestra incluso presentándose en estado de vapor existente en el entorno del laboratorio (en cantidades dependientes del clima y la humedad atmosférica). El problema se

⁷⁴ Sarazin, C.; Goethals, G.; Seguin, J.P.; Legoy, M.D. y Barbotin, J.N. (1992) *J. Chim. Phys.*, **89**, 541-547.

⁴⁶ Zaks, A. y Klibanov, A.M. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 8017-8021.

⁴⁷ McMinn, J.H.; Sowa, M.J.; Charnick, S.B.; Paulaitis, M.E. (1993) *Biopolymers*, **33**(8), 1213-24.

⁷⁵ Yamane, T.; Kojima, Y.; Ichiyu, T. y Shimizu, S. (1988) *Ann. NY Acad. Sci.*, **542**, 282-293.

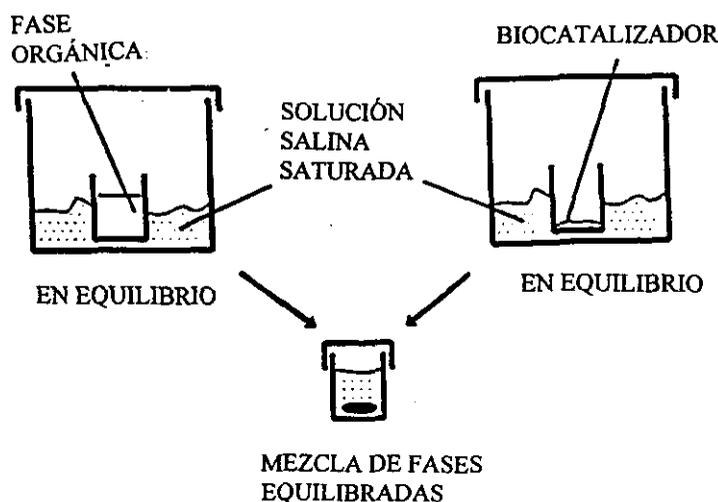
⁷⁶ Yamane, T.; Kojima, Y.; Ichiyu, T.; Nagata, M. y Shimizu, S. (1989) *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 392-397.

⁴⁸ Gorman, L.A.S. y Dordick, J.S. (1992) *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 392-397.

complica cuando el agua de la muestra está en una cantidad muy pequeña. Un medio basado en n-hexano puede experimentar importantes cambios en a_w cuando se expone a la atmósfera durante menos de un minuto, o por contacto con las superficies de jeringas, etc.⁷⁷

En biocatálisis tan importante como la medida de a_w es el control de este parámetro a un valor determinado. Los componentes de la mezcla de reacción pueden equilibrarse a un valor de a_w conocida a través de la fase gaseosa, usando soluciones salinas saturadas para poder generar una atmósfera de un valor de a_w determinado. Esta fue la aproximación empleada en la biocatálisis en medios no convencionales por Goderis y col.⁷⁸ y posteriormente ha sido también empleada por otros investigadores. El método se presenta en el Esquema I.3.

Esquema I.3. Representación del método de preequilibrado a una a_w determinada.



Sin embargo, el preequilibrado inicial a una a_w determinada no asegura que este valor vaya a ser permanente durante el proceso de la reacción. Tal y como lo demostraron Goldberg y col.⁷⁹

⁷⁷ Khan, S.A. (1988) *Ph. D. Thesis*. Universidad de Strathclyde.

⁷⁸ Goderis, H.; Ampe, G.; Feyten, M.; Fouwé, B.; Guffens, W. et al. (1987) *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 258-266.

⁷⁹ Goldberg, M.; Thomas, D. y Legoy, M.D. (1990) *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 976-981.

en la esterificación catalizada por la lipasa de *Candida rugosa* en un sistema bifásico sin adición de disolventes orgánicos y posteriormente también ha sido comprobado por otros autores.^{80,70} Hay que tener en cuenta la presencia de dos procesos:

- i) consumo o generación de agua durante la reacción,
- ii) solvatación y comportamiento de la fase.

La formación puede eliminarse estudiando el proceso sólo a bajas conversiones, donde la estequiometría que representa el agua es insignificante. Sin embargo, existen reacciones donde pueden afectar considerablemente.

Si dos componentes, preequilibrados por separado a una a_w determinada se mezclan, la a_w permanecerá constante sólo si hay una relación precisa de los coeficientes de actividad para el agua en los dos componentes y su mezcla. Por tanto, la aproximación más útil es preequilibrar por separado y luego dispersar un componente en el otro para formar la mezcla de reacción. En este caso la a_w no tiene por qué cambiar debido a que ambas fases están en equilibrio en lo que a distribución de agua entre ellas se refiere.^{81,82} Si existen otros componentes en la mezcla, que también se redistribuyen entre las fases, se puede alterar el valor de a_w ya que se altera la composición entre las fases afectando, en consecuencia, a los coeficientes de actividad para el agua. Por tanto, esta posibilidad hay que tenerla en cuenta. Este es el caso de Nordin y col.⁸³ que preparan una transesterificación catalizada por *Ps. fluorescens* equilibrando los reactivos de la

⁸⁰ Kramer, G.; Batenburg, L.; Derksen, J. y Cuperus, F. (1997) *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **3**, 121-125.

⁷⁰ Goldberg, M.; Parvaresh, F.; Thomas, D. y Legoy, M.D. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, **957**, 359-362.

⁸¹ De la Casa, R.M.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1996) *Biotechnol. Lett.*, **18**, 13-18.

⁸² Odalepo, D.; Halling, P. y Larsen, V. (1994) *Biocatalysis*, **8**(4), 283-7.

⁸³ Nordin, O.; Hedenström, E. y Högberg, H. (1994) *Tetrahedron Asymm.*, **5**, 785-788.

reacción, así como el biocatalizador y el medio a un valor seleccionado de a_w .

Entre los métodos para controlar la a_w a lo largo de una reacción catalizada en medios orgánicos, nos encontramos:

- i) sensores que realizan una medida directa en el medio,³⁷
- ii) soluciones salinas saturadas,⁸⁴
- iii) sales hidratadas,⁸⁵
- iv) sílica gel equilibrado a una determinada a_w .⁷⁰

Es más difícil mantener constante la a_w en reacciones que producen o consumen agua (por ejemplo, la esterificación entre un ácido y un alcohol) debido a que el agua debe ser retirada o añadida durante la reacción.

En general, estas aproximaciones no son prácticas a amplia escala debido al alto coste, la dificultad para equilibrar bajos valores de a_w y dificultad añadida a la hora de recuperar el biocatalizador. El inconveniente de estos métodos es que la presencia de estas sales hidratadas y soluciones salinas pueden provocar alteraciones en el biocatalizador al estar en contacto con él durante el proceso de la reacción y además la recuperación de las mismas es un tanto complicada.

Por esta razón, se han probado otras alternativas, con buenos resultados, como es el empleo de un reactor en el que está presente una fase gaseosa equilibrada a una a_w determinada

³⁷ Sakai, T.; Kawabata, I.; Kishimoto, T.; Ema, T. y Utaka, M. (1997) *J. Org. Chem.*, **62**, 4906-4907.

⁸⁴ Rosell, C.M.; Vaidya, A.M. y Halling, P.J. (1996) *Biotechnol. Bioeng.*, **49**, 284-289.

⁸⁵ Kvittingen, L.; Sjursnes, B.J.; Anthonsen, T. y Halling, P.J. (1992) *Tetrahedron*, **48**, 2793-2802.

⁷⁰ Goldberg, M.; Parvareh, F.; Thomas, D. y Legoy, M.D. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, **957**, 359-362.

y en constante circulación.^{86,87}

Otra alternativa es emplear pares de sales hidratadas de a_w conocida, que actúan a modo de tampón de a_w dentro de la mezcla de reacción, pero manteniéndolas aisladas para que no entren en contacto con el biocatalizador y así facilitar la recuperación de las mismas. Dentro de esta estrategia se han empleado diferentes alternativas para encapsular estas sales: membranas de poliamida,⁸⁸ tubo de silicona sumergido en el medio de reacción,^{89,90} membrana de polipropilentereftalato.⁷³ También se ha probado modificando la ingeniería del reactor para mantener estas sales presentes durante el proceso de reacción sin alterar la composición de la mezcla.^{84,91}

La importancia de a_w en reacciones catalizadas por enzimas queda manifiestamente avalada en la bibliografía; sin embargo, encontrar una relación directa entre actividad enzimática y valor de a_w óptimo es difícil ya que no existe una regla general aplicable a todos los casos. Ya que las lipasas difieren en la cantidad de agua que necesitan para maximizar la velocidad de esterificación de una reacción catalizada enzimáticamente en medio orgánico.

Así en el caso de *Pseudomonas cepacia* la estabilidad está favorecida cuando trabaja con

⁸⁶ Ujang, Z.; Al-Sharbaty, N. y Vaidya, A.M. (1997) *Biotechnol. Prog.*, **13**(1), 39-42.

⁸⁷ Wehtje, E.; Kaur, J.; Svensson, I.; Adlercreutz, P. y Mattiasson, B. (1996) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **799**, (Enzyme Engineering XIII), 351-357.

⁸⁸ Hessbruegge, B.J. y Vaidya, A.M. (1997) *J. Membr. Sci.*, **128**(2), 175-182.

⁸⁹ Wehtje, E.; Svensson, I.; Adlercreutz, P. y Mattiasson, B. (1993) *Biotechnol. Tech.*, **7**, 873-878.

⁹⁰ Wehtje, E.; Kaur, J.; Adlercreutz, P.; Chand, S. y Mattiasson, B. (1997) *Enzyme Microb. Technol.*, **21**, 502-510.

⁷³ Degn, H. y Frigaard, N.-U. (1993) *Anal. Chim. Acta*, **274**(2), 355-9.

⁸⁴ Rosell, C.M.; Vaidya, A.M. y Halling, P.J. (1996) *Biotechnol. Bioeng.*, **49**, 284-289.

⁹¹ Rosell, C. y Vaidya, A. (1995) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**(3-4), 283-6.

bajos valores de a_w .⁹² Trabajando en el mismo intervalo nos encontramos con la lipasa de *Rhizomucor miehei*, que alcanza mayores rendimientos con menor valor de a_w .⁹³ Igualmente la termoestabilidad de la quimotripsina liofilizada aumenta a menor a_w ,⁹⁴ así como el rendimiento de la hidrólisis catalizada por la amidasa de *Aspergillus oryzae*.⁹⁵

Por otro lado también nos encontramos referencias de reacciones que están favorecidas por altos valores de a_w , como es el caso de la síntesis de triacilglicerol catalizada enzimáticamente,⁹⁶ o la síntesis de péptidos catalizada por termolisina.⁹⁷

Lo que sí está claro es que la relación entre la actividad catalítica y la a_w depende del tipo de lipasa tal y como confirmaron Valivety y col.⁹⁸ Esta afirmación fue corroborada posteriormente por Svensson y col.⁹⁹ al estudiar la influencia de a_w en la velocidad de reacción entre diferentes lipasas para una misma reacción. Así la lipasa de *Rhizopus arrhizus* alcanza el máximo rendimiento y la máxima velocidad con una a_w de 0,33, mientras que la lipasa de *Pseudomonas* requiere para estos mismos resultados valores mucho más altos de a_w . Estos autores incluso comprobaron que para una misma lipasa su actividad catalítica podía estar influida por más de un valor de a_w óptimo. Esto ocurría con la lipasa de *Pseudomonas* que para alcanzar una alta

⁹² Arcos, J.A.; Robledo, L. y Otero, C. (1997) *Biocatal. Biotransform.*, **14(4)**, 251-267.

⁹³ López-Belmonte, M.T.; Alcántara, A. y Sinisterra, J.V. (1997) *J. Org. Chem.*, **62(6)**, 1831-1840.

⁹⁴ Wehtje, E.; de Wit, H. y Adlercreutz, P. (1996) *Biotechnol. Tech.*, **10(12)**, 947-952.

⁹⁵ Rajnochova, E.; Dvorakova, J.; Hunkova, Z. y Kren, V. (1997) *Biotechnol. Lett.*, **19(9)**, 869-872.

⁹⁶ Van der Padt, A.; Sewalt, J. y Vant'Riet, K. (1992) *Prog. Biotechnol.*, **8**, 557-62.

⁹⁷ Hwang, K.; Lee, S. y Lee, K. (1995) *Biotechnol. Lett.*, **17(1)**, 71-6.

⁹⁸ Valivety, R.H.; Halling, P.J.; Peilow, A.D. y Macrae, A.R. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1122**, 143-146.

⁹⁹ Svensson, I.; Wehtje, E.; Adlercreutz, P. y Mattiasson, B. (1994) *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 549-556.

velocidad inicial de reacción necesitaba altos valores de a_w ; mientras que a lo largo de la reacción una disminución en el valor de a_w aumentaba el rendimiento.

Otro ejemplo es el caso de la esterificación del ácido decanoico con dodecanol catalizada por la lipasa de *Rhizomucor miehei*, con la que se obtuvo la máxima actividad con $0,3 < a_w < 0,5$; mientras que empleando la lipasa de *Candida rugosa* el valor óptimo fue $a_w \approx 1,0$.

También diferentes reacciones necesitan distinto valor de a_w óptimo. Así la velocidad de esterificación entre el glicerol y ácido oleico usando la lipasa de *Rhizomucor miehei* no cambió significativamente al cambiar a_w ; pero la síntesis de dioleína a partir de monoleína fue más rápida con $a_w = 0,5$ y la síntesis de trioleína fue más rápida con valores inferiores de a_w .¹⁰⁰

Dado el interés que despierta la relación de a_w con la actividad catalítica, Valivety y col.¹⁰¹ comprobaron que el grado de pureza enzimática y la naturaleza del soporte (excepto si éste es hidrófobo) no influyen en esta relación. Mientras que los perfiles de actividad catalítica vs a_w sí dependen de la carga del soporte y del grado de glicosilación de las proteínas. El estudio de estos perfiles se realizó también con la lipasa de *Candida rugosa* por Wehtje y col.¹⁰² comprobándose que no dependían de la reacción que catalizaba la enzima, ya fuera hidrólisis, esterificación o transesterificación. Así mismo observaron que la reacción de transesterificación no estaba afectada por el valor de a_w ; mientras que en el caso de la reacción de hidrólisis el aumento de a_w favorecía el rendimiento final.

Igualmente en el estudio de la esterificación catalizada por la lipasa de *Candida rugosa*

¹⁰⁰ Dudal, Y. y Lortie, R. (1995) *Biotechnol. Bioeng.*, **45**(2), 129-34.

¹⁰¹ Valivety, R.; Halling, P.J.; Peilow, A. y Macrae, A. (1994) *J. Biochem.*, **222**(2), 461-6.

¹⁰² Wehtje, E. y Adlercreutz, P. (1997) *Biotechnol. Lett.*, **19**(6), 537-540.

en éter diisopropílico,¹⁰³ la reacción se vio favorecida por un aumento de a_w , que provocaba un incremento de la V_{max} ; además también se afectó en otros aspectos de la cinética del biocatalizador como lo demuestra el ligero aumento de la K_m del ácido y el considerable incremento de la K_m del alcohol para altos valores de a_w . Este aumento de K_m depende de la enzima y del disolvente empleado como medio de reacción y es debido al incremento de la competición del agua como nucleófilo para la formación del complejo acil-enzima cuando se trabaja con altos valores de a_w .

Respecto a la influencia de a_w en la enantioselectividad de la lipasa de *Candida rugosa* no queda muy claro que exista una relación directa según los datos presentes en la literatura. Si bien se ha comprobado que en la esterificación catalizada por dicha enzima en ciclohexano, el valor de a_w sí afecta a la enantioselectividad.^{104,105,106} Por otro lado Wehtje y col.¹⁰⁷ estudiaron la influencia de a_w en la enantioselectividad de la lipasa de *Candida rugosa* al catalizar la esterificación de alcoholes secundarios con ácido decanoico y no encontraron ninguna relación. Sin embargo, observaron un ligero incremento de la enantioselectividad al aumentar a_w cuando se empleó tolueno como disolvente. Por otro lado, para la resolución de senderol aumentando a_w hubo diferentes resultados al cambiar de disolvente. Esta variación refleja que el efecto de los diferentes disolventes en la enantioselectividad todavía está por estudiar. En contraposición

¹⁰³ Wehtje, E. y Adlercreutz, P. (1997) *Biotechnol. Bioeng.*, **55**(5), 798-806.

¹⁰⁴ Högtber, H.E.; Edlund, H.; Berglund, P. y Hedenström, E. (1993) *Tetrahedron: Asymmetry*, **4**, 2123-2126.

¹⁰⁵ Berglund, P.; Voerde, C. y Hoegberg, H.E. (1994) *Biocatalysis*, **9**, 123-130.

¹⁰⁶ Lundh, M.; Smitt, O. y Hedenstroem, E. (1996) *Tetrahedron: Asymmetry*, **7**(11), 3277-3284.

¹⁰⁷ Wehtje, E.; Costes, D. y Adlercreutz, P. (1997) *J.Mol. Catal. B: Enzyme*, **3**(5), 221-230.

Bovara y col.¹⁰⁸ no encontraron ninguna relación entre la a_w y la enantioselectividad en la transesterificación de sulcatol con acetato de vinilo catalizada enzimáticamente.

En definitiva hay que decir que la a_w influye en la velocidad inicial de esterificación catalizada por lipasa en medios orgánicos ligeramente hidratados.¹⁰⁹ De hecho, el agua producida por la reacción de esterificación es capaz de activar o inactivar al provocar cambios en el estado de hidratación de la preparación enzimática. Por otro lado, la dependencia de la actividad catalítica con respecto a a_w varía poco al cambiar la polaridad del disolvente. Sin embargo, la concentración de agua necesaria para mantener la misma a_w para diferentes disolventes varía ampliamente según demostraron Zaks y Klivanov.⁴⁶ Posteriormente se comprobó que la cantidad de agua que rodeaba a la enzima depende de la a_w del sistema.¹¹⁰

En la mayoría de las reacciones enzimáticas se emplea el medio orgánico. Para maximizar el rendimiento de productos sintéticos, es preferible reducir la actividad termodinámica del agua (a_w) por debajo de 1 (valor para el agua pura), las enzimas pueden retener actividad bajo estas condiciones y el cambio del equilibrio conduce a un aumento del rendimiento de los productos deseados. Sin embargo, la cantidad de agua y a_w no pueden reducirse hasta el límite, ya que la actividad catalítica de la enzima se perdería: el contenido crítico de agua varía de un catalizador a otro, y la a_w también. Por esto, habrá una a_w óptima para cada proceso.

En reacciones de esterificación catalizadas por la lipasa de *Candida rugosa* el valor de a_w depende de varios factores:

¹⁰⁸ Bovara, R.; Carrea, G.; Ottolina, G. y Riva, S. (1993) *Biotechnol. Lett.*, **15(9)**, 937-42.

¹⁰⁹ Valivety, R.H.; Halling, P.J. y Macrae, A.R. (1992) *Biocatalysis in Non-Conventional Media*, pag. 549. Eds.: Tramper, J. y col. Elsevier. Amsterdam. Holanda.

⁴⁶ Zacks, A. y Klivanov, A.M. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 8017.

¹¹⁰ Halling, P.J. (1989) *Trends Biotechnol.*, **7**, 50.

- la agitación⁷⁹
- la masa de la preparación enzimática que determina la capacidad de la lipasa para producir el agua suficiente en su entorno inmediato⁴⁶
- la acuofilia de la preparación enzimática¹¹¹
- el estado de hidratación del biocatalizador y del disolvente¹¹²
- la concentración de agua y la polaridad del medio¹²
- la interfase entre la fase acuosa y la orgánica también es esencial en la actividad de la lipasa¹¹³
- la concentración del sustrato, repercutiendo a su vez en la cinética del catalizador.¹¹⁴

Se pueden emplear varias estrategias para ajustar la actividad de agua óptima para una determinada reacción. Por un lado, añadiendo cantidades variables de agua y midiendo la velocidad inicial y obtener así unas condiciones óptimas; y por otro lado, pre-equilibrar el disolvente y el enzima por separado con soluciones salinas saturadas de a_w conocida, hasta encontrar el valor de a_w óptimo, que no tiene que coincidir con el de la enzima y el disolvente por separado.¹⁰⁰ Este punto constituye uno de los aspectos más interesantes de la Biosíntesis en medios orgánicos y será desarrollado en la presente Memoria.

⁷⁹ Goldberg, M.; Thomas, D. y Legoy, M.D. (1990) *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 976.

¹¹¹ Reslow, M.; Adelcreutz, P. y Mattiasson, B. (1988) *Eur. J. Biochem.*, **172**, 573.

¹¹² Deetz, J.S. y Rozzell, J.D. (1988) *TIBTECH*, **6**, 15.

¹² Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K. y Veeger, C. (1987) *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 81.

¹¹³ Desnuelle, P. (1972) *The Enzymes*, p. 575. 3^{ra} ed. vol VII. Academic. Press. Inc. P.D. Boyer.

¹¹⁴ Fureby, A.M.; Tian, L.; Adlercreutz, P. y Mattiasson, B. (1997) *Enzyme Microb. Technol.*, **20**, 198-206.

¹⁰⁰ Dudal, Y. y Lortie, R. (1995) *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 129-134.

1.5.3. Análisis termogravimétrico de los biocatalizadores sólidos.

La definición generalmente aceptada de análisis térmico abarca al grupo de técnicas en las que se mide la variación de una propiedad física de una sustancia y/o de sus productos de reacción en función de la temperatura, mientras la sustancia se somete a un programa de calefacción controlado. Se pueden distinguir más de una docena de métodos térmicos, que difieren en las propiedades medidas y en los programas de temperatura. Estos métodos encuentran una amplia aplicación tanto en el control de calidad como en investigación de productos industriales, tales como polímeros, productos farmacéuticos, arcillas, minerales, metales y aleaciones. El comentario siguiente se centrará básicamente en dos métodos, los cuales proporcionarán información química básica de muestras de materiales. Estos métodos incluyen la termogravimetría (TG) o análisis térmico gravimétrico, y el análisis térmico diferencial (ATD).

Análisis térmico gravimétrico.

En un análisis termogravimétrico se registra continuamente la variación de la masa de una muestra colocada en una atmósfera controlada al ir aumentando la temperatura de la muestra de forma lineal con el tiempo (en una relación definida). La representación de la variación de la masa en función de la temperatura expresada en % generalmente, se denomina termograma o curva de descomposición térmica.⁴⁵

⁴⁵ Skoog & Leary, *Análisis Instrumental*. Ed. Mc Graw-Hill.

Análisis térmico diferencial.

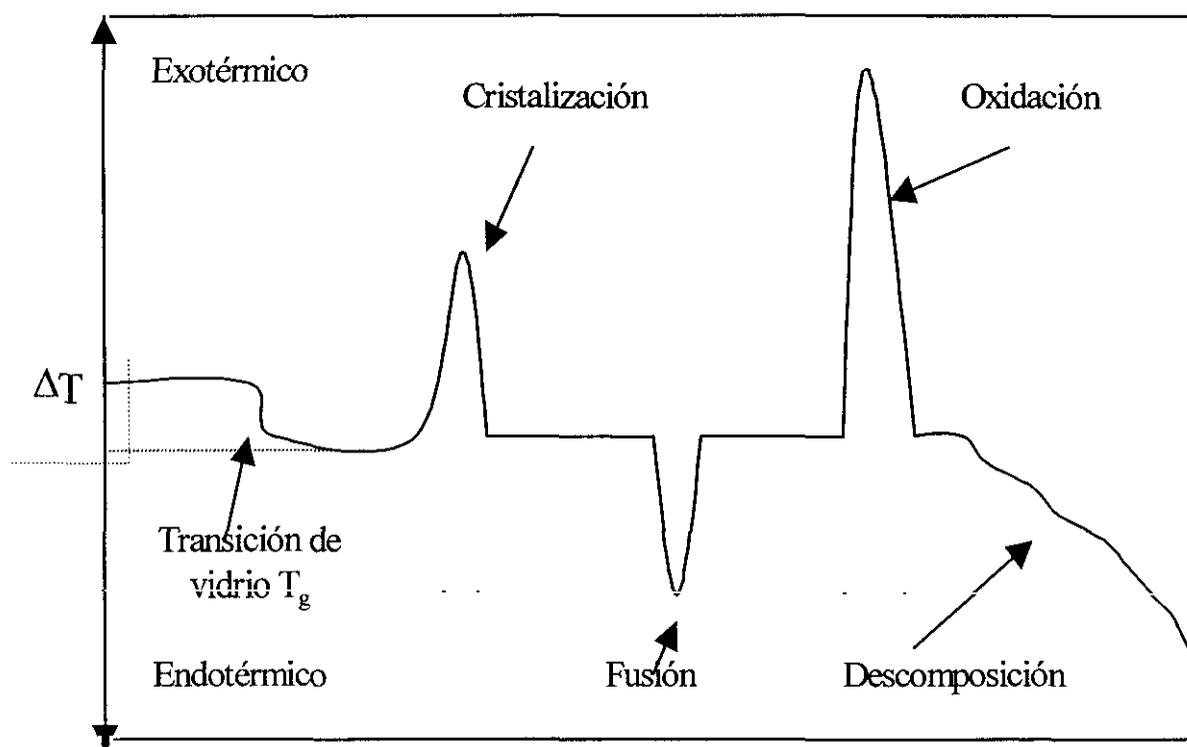
El análisis térmico diferencial es una técnica en la que se mide la diferencia de temperatura entre una sustancia y un material de referencia en función de la temperatura cuando la sustancia y el patrón se someten a un programa de temperatura controlado. Normalmente, el programa de temperatura implica el calentamiento de la muestra y del material de referencia de tal manera que la temperatura de la muestra T_s aumenta linealmente con el tiempo. Se controla la diferencia de temperatura ΔT entre la temperatura de la muestra y la temperatura de la referencia T_r ($\Delta T = T_r - T_s$) y se representa frente a la temperatura para dar un termograma diferencial tal como el que se muestra en la Figura I.7.

La disminución inicial de temperatura que aparece en todos los ATD es debida a la transición de vidrio, un fenómeno observado inicialmente cuando se calientan la mayoría de los polímeros. En el termograma de la Figura I.7 se observan dos máximos y un mínimo, todos ellos se llaman picos. Los dos máximos son el resultado de los procesos exotérmicos en los que el calor se desprende de la muestra, provocando que su temperatura aumente, el mínimo llamado fusión es la consecuencia de un proceso endotérmico en el que el calor es absorbido por el analito. Muchos polímeros amorfos empiezan a cristalizar en forma de microcristales, emitiéndose calor en este proceso. La formación de cristales es la responsable del primer pico exotérmico. El área del pico se hace mayor al disminuir la velocidad de calentamiento, ya que en estas circunstancias tienen tiempo de formarse y de crecer .

El segundo pico de la figura es endotérmico e implica la fusión de los microcristales formados en el proceso exotérmico inicial, este tipo de pico también aparece en procesos de evaporación de agua. El tercer pico es exotérmico y se encuentra sólo si el calentamiento se lleva

a cabo en presencia de aire o de oxígeno (en nuestro caso no es posible ya que trabajamos en atmósfera de nitrógeno). Este pico es el resultado de la oxidación exotérmica de un polímero. El cambio negativo final en ΔT es debido a la descomposición endotérmica del polímero para dar lugar a una gran variedad de productos.

Figura I.7. Análisis térmico diferencial.



Como se sugiere en la Figura I.7 los picos del análisis térmico diferencial resultan tanto de cambios físicos como de reacciones químicas inducidas por cambios de temperatura en la muestra. Entre los procesos físicos que son endotérmicos se incluyen la fusión, la vaporización, la sublimación, la absorción y la desorción. La adsorción y la cristalización son generalmente exotérmicos. Las reacciones químicas pueden ser exotérmicas o endotérmicas. Entre las reacciones endotérmicas se encuentran la deshidratación, la reducción en una atmósfera inerte y la descomposición. Las reacciones exotérmicas incluyen la oxidación en aire u oxígeno y la polimerización. Las áreas de los picos en los termogramas diferenciales dependen de la masa de la muestra, m , de la entalpía ΔH , del proceso químico o físico y de ciertos factores geométricos y de conductividad, estas variables están relacionadas por la ecuación:

$$A = -K G m \Delta H = -K' m \Delta H \quad [5]$$

Donde A es el área del pico, G es un factor de calibrado que depende de la geometría de la muestra y K es una constante relacionada con la conductividad térmica de la muestra. El convenio de asignación de signos negativos a un cambio de entalpía justifica el signo negativo en la ecuación. Para una especie dada, K' permanece constante siempre que un cierto número de variables – tales como la velocidad de calentamiento, el tamaño de la partícula y la colocación de la muestra respecto al termopar- estén cuidadosamente controladas. En estas condiciones, la ecuación se puede utilizar para determinar:

- a) la masa de un analito concreto si K' e ΔH se pueden determinar mediante calibración
- b) la variación de entalpía si se conocen K' y m .

Recientemente Gentili y col.¹¹⁶ pusieron de manifiesto que las técnicas termoanalíticas

¹¹⁶ Gentili, A.; Curini, R.; Cernia, E. y D'Ascenzo, G. (1997) *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **3**, 43-49.

permitían obtener una información detallada de la cantidad de agua unida a una proteína sólida por análisis termogravimétrico (ATG) y de la fuerza de unión de aquella a la proteína por análisis térmico diferencial (ATD).

Este estudio se lleva a cabo calentando la muestra sólida en una cápsula de platino y analizando la pérdida de peso (ATG) y la variación de la temperatura del sólido durante el proceso (ATD).

Mediante esta técnica, acoplada a un espectro IR con transformada de Fourier (FTIR) se puede determinar qué sustancias se eliminan y a qué temperatura. Este último dato está relacionado directamente con la fuerza de unión del agua a la proteína. Evidentemente, cuánto mayor es la temperatura a la que se elimina, más fuertemente unida está el agua a la proteína.

1.6. Técnicas de modulación del agua del microentorno.

De todo lo dicho, cabe deducir que el papel del agua en el microentorno de una enzima sólida es fundamental para su actividad y enantioselectividad como biocatalizador.

Por ello, se han buscado, sin lograrlo, metodologías para modular el contenido de agua del microentorno y modular así la actividad enzimática, especialmente en el caso de la hidrólisis. Estas metodologías se pueden clasificar en dos grandes grupos según se actúe sobre el macroentorno o el microentorno del biocatalizador.

Tabla I.5. Principales metodologías empleadas para la modulación del agua del biocatalizador.

Macroentorno	adición/eliminación de agua del medio orgánico
	empleo de disolventes miméticos del agua
Microentorno	modificación no covalente: - micelas reversas - adición de polímeros
	modificación covalente: - unión a polímeros hidrófobos - unión a polímeros anfífilicos - unión a polímeros hidrófilos

Seguidamente comentaremos brevemente las distintas metodologías.

1.6.1. Empleo de disolventes miméticos del agua.

La adición/eliminación del agua del medio, controlando el nivel de hidratación del disolvente orgánico, creemos no merece comentario, y es la más insegura de utilizar cuando se está estudiando por primera vez el nivel de hidratación del microentorno de un catalizador sólido. Este trabajo siempre debe ir acompañado de un estudio riguroso de las isothermas de sorción del disolvente y del biocatalizador juntos.^{81,116}

Como ha sido indicado hasta el momento las enzimas dependen del agua para la mayoría de las interacciones no covalentes que ayudan a mantener la conformación catalíticamente activa. Dependiendo del tipo de enzima con la que estemos trabajando, la cantidad de agua requerida para mantener la actividad catalítica es función del tipo de biocatalizador y del medio en el que tiene lugar la reacción que cataliza.

El agua presente en un sistema bifásico puede separarse en dos categorías físicas distintas:

i) la mayoría del agua (> 98 %) actúa como verdadero disolvente,

ii) una pequeña fracción está íntimamente unida a la enzima,

por tanto, el estado físico del agua unida a la enzima es diferente del que actúa como disolvente.

Teniendo en cuenta esto y aplicándolo a la catálisis enzimática en medio orgánico sería posible sustituir parcialmente el agua íntimamente unida por un disolvente, sin alterar significativamente el medio de la enzima, a través de los llamados miméticos del agua.

Dentro de este enfoque se encuentra el trabajo realizado por Gubicza y Kelemen-

⁸¹ De la Casa, R.M.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1996) *Biotechnol. Lett.*, **18**, 13-18.

¹¹⁶ Arroyo, M.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1998) *Enzyme Microb. Technol.*, **24**, 3-12

Horv th¹¹⁷ en el que se demuestra un aumento de la actividad y enantioselectividad de la lipasa de *Candida cylindracea* al sustituir el agua por un mimético como es el etilénglicol. El estudio se basa en que el agua presente en reacciones enzimáticas en medios orgánicos actúa a modo de lubricante proporcionando una molécula de proteína con la flexibilidad requerida para la catálisis enzimática. Este papel que tiene el agua como lubricante se basa en su capacidad para formar enlaces tipo puentes de hidrógeno con grupos funcionales de las moléculas de proteína.^{46,18}

Según esto, cualquier compuesto que físicamente tenga las mismas propiedades que el agua para la formación de enlaces de hidrógeno puede actuar de manera similar.¹¹⁸

Una de las contribuciones más interesantes que pueden realizar los miméticos del agua es el hecho de que el efecto sobre la actividad catalítica es más favorable cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de disolventes con alto log P, cuya hidrofobicidad favorece la velocidad de reacción.^{118,119} Por el contrario, si se usan disolventes altamente hidrofílicos éstos pueden retirar de la enzima la cantidad de agua necesaria para la actividad catalítica provocando una pérdida de actividad.

Gubicza y col.¹¹⁷ comprobaron que existe una cantidad óptima de mimético del agua que se puede añadir al medio de reacción. Este hecho confirma que el agua tiene dos funciones distintas en la reacción catalizada enzimáticamente. Parte de ella es irremplazable y

¹¹⁷ Gubicza, L. y Kelemen-Horváth, I. (1993) *J. Mol. Catal.*, **84**, 27-32.

⁴⁶ Zaks, A. y Klibanov, A.M. (1992) *J. Biol. Chem.*, **263**, 8017.

¹⁸ Goldberg, M.; Thomas, D. y Legoy, M.-D. (1990) *Eur. J. Biochem.*, **190**, 603.

¹¹⁸ Kitaguchi, H.; Itoh, I. y Ono, M. (1990) *Chem. Lett.*, 1203.

¹¹⁹ Laane, C.; Borren, S.; Hilhorst, R. y Veeger, C. (1987) en *Biocatalysis in Organic Media*, p. 65. Eds.: Laane, C.; Tramper, J. y Lilly, M.D., Elsevier, Amsterdam.

correspondería a la monocapa de agua que recubre al biocatalizador y la otra parte, sólo parcialmente se puede sustituir con miméticos, provocando el correspondiente aumento de la actividad enzimática al impedir el desplazamiento del equilibrio hacia la izquierda, ya que la concentración del agua total es menor en el sistema.

Otra consecuencia importante al disminuir la cantidad de agua por un mimético es que la estructura enzimática se vuelve más rígida, provocando un aumento de la enantioselectividad lo cual favorece que la enzima sea capaz de discernir de manera más clara entre los dos enantiómeros.

Por ello, se puede concluir que es la interacción enzima-agua el factor determinante de una reacción enzimática en medios ligeramente hidratados, mucho más que la interacción enzima-disolvente. No obstante, el efecto del disolvente tiene un papel relevante, ya que es capaz de actuar sobre la actividad y enantioselectividad del biocatalizador, alterándose estas características al pasar de un disolvente a otro con diferente log P. Sin embargo, es el empleo de miméticos del agua el hecho que va a permitir una mejora de la actividad y enantioselectividad de los biocatalizadores.

Con este mismo enfoque hay un trabajo de Kazlauskas y col.¹²⁰ en el que comprobaron que el tratamiento de la lipasa de *Candida rugosa* con 2-propanol provocaba un aumento de la actividad específica y enantioselectividad de la enzima en la resolución de ácidos carboxílicos sustituidos en la posición 2. Este estudio está basado en los resultados obtenidos por Hedström y col.¹²¹ en el tratamiento de soluciones acuosas de la lipasa de *Candida rugosa* con un disolvente

¹²⁰ Colton, I.J.; Ahmed, S.N. y Kazlauskas, R.J. (1995) *J. Org. Chem.*, **60**, 212-217.

¹²¹ Hedström, G.; Backlund, M. y Slotte, J.P. (1993) *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 618-624.

orgánico y conformaron un aumento considerable de la enantioselectividad en la esterificación del ácido (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico en una microemulsión de agua en isooctano estabilizada por bis(2-etilhexil) sulfosuccinato, mientras que reacciones similares desarrolladas en agua o isooctano sólo, fueron poco enantioselectivas.

La explicación de estos resultados según Kazlauskas¹²⁰ es que el tratamiento con 2-propanol convierta la forma cerrada de la proteína en forma abierta.¹²² La transición entre ambos estados requiere únicamente el movimiento de la tapadera. El movimiento de la tapadera desde la conformación cerrada hasta la abierta está asociado con:

a) Un reordenamiento de la estructura secundaria durante el cual la tapadera gira casi 90°, desde un plano horizontal sobre la superficie proteica hasta otro casi perpendicular a ella. El movimiento de la tapadera no puede, sin embargo, ser descrito como una rotación de un cuerpo rígido simple, aunque tiene los puntos de bisagra bien definidos en los residuos Glu-66 y Pro-92. Se trata de un balanceo de la hélice $\alpha_{b3,2}$, cuyo centro viaja una distancia de 19 Å al extremo N, hasta convertirse en la conformación abierta, en la parte de la tapadera más expuesta al disolvente.

b) Una isomerización *cis-trans* de la Pro-92, que probablemente aumente la energía requerida para la transición entre los dos estados y puede jugar un papel importante en la estabilización de la conformación activa de la interfase agua/lípido. Es interesante destacar que la conformación *trans*, más favorecida energéticamente sea la que adopta la conformación abierta, desplazando el equilibrio en esa dirección. Este papel decisivo de la isomerización *cis-trans* del enlace peptídico puede no ser una característica general de esta familia de lipasas, sino bastante

¹²⁰ Colton, I.J.; Ahmed, S.N. y Kazlauskas, R.J. (1995) *J. Org. Chem.*, **60**, 212-217.

¹²² Radzicka, A.; Acheson, S.A. y Wolfenden, R. (1992) *Biorg. Chem.*, **20**, 382-386.

específica de la lipasa de *Candida rugosa*.¹²³

1.6.2. Modificación no covalente del microentorno.

La optimización de un proceso biocatalítico implica el control de los factores que afectan a la actividad y estabilidad de un biocatalizador. Para este propósito se han empleado diferentes estrategias, como es el caso de la inmovilización de un biocatalizador sobre un soporte que ha mostrado ser uno de los mejores métodos para aumentar la termoestabilidad enzimática.¹²⁴

Otra estrategia ampliamente utilizada ha sido el empleo de aditivos, tales como: sales, polioles, polímeros, azúcares, etc. que se han comportado como estabilizadores de las proteínas.

Así, se ha comprobado el efecto positivo que tiene sobre la actividad la adición de NaCl en la hidrólisis de tributirina catalizada por la lipasa de *Candida rugosa*.¹²⁵ En la misma línea Hernáiz y col.¹²⁶ han comprobado que la adición de NaCl y CaCl₂ al medio de reacción aumentan la actividad enzimática de la lipasa comercial de *Candida rugosa* (LCRC) y del derivado semipurificado (LCRS) en la hidrólisis del aceite de oliva. Resultados similares tuvieron Arroyo y col.¹²⁷ en la hidrólisis del aceite de oliva catalizada por la LCRC en estado nativo e inmovilizada

¹²³ Grochulski, P.; Li, Y; Schrag, J.D. y Cygler, D. (1994) *Prot. Science*, **3**, 82-91.

¹²⁴ Basri, M.; Ampon, K.; Zinwan Yunus, W.N.; Razak, Ch.N.A. y Salleh, A.B. (1995) *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **64**, 10.

¹²⁵ Sánchez, E.V.; Bello, J.F.; Roig, M.G.; Burguillo, F.J.; Moreno, J.M. y Sinisterra, J.V. (1996) *Enzyme Microb. Technol.*, **18**, 468-476.

¹²⁶ Hernáiz, M.J.; Rúa, M.; Celda, B.; Medina, P.; Sinisterra, J.V. y Sánchez-Montero, J.M. (1994) *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **44**, 213-229.

¹²⁷ Arroyo, M.; Moreno, J.M. y Sinisterra, J.V. (1993) *J. Mol. Catal.*, **83**, 261-271.

en agarosa y zuro de maiz mediante una activación por cloruro de tosilo. Siguiendo esta metodología encontraron un manifiesto aumento de la k_{cat} que fue menor en las preparaciones inmovilizadas que en la enzima nativa.

Respecto al empleo de polioles, se sabe que son precursores de un ambiente favorable para la enzima, ya que mantienen tanto las interacciones hidrofóbicas intramoleculares, esenciales para la estructura nativa de la proteína; como así, la primera capa de hidratación alrededor de la molécula del biocatalizador.¹²⁸

En esta línea, se ha comprobado que en la síntesis del dipéptido kyotorfina catalizada por la α -quimotripsina inmovilizada en Celite, la presencia de sorbitol aumenta la actividad sintética. Este efecto se atribuye a que el aditivo reduce la cantidad de moléculas libres de agua del sistema, favoreciendo el desplazamiento del equilibrio termodinámico hacia la reacción de síntesis.¹²⁹ Por otro lado, la presencia del polirol modifica favorablemente el microambiente de la enzima y mantienen la capa de hidratación que rodea al biocatalizador.¹³⁰ Gekko y Timasheff¹³¹ también concluyeron que la hidrofilia de los polioles aseguraba la capa de solvatación y la exposición de los grupos no polares se mantenía intacta a la temperatura ensayada, permitiendo la estabilización de la proteína.

Sin embargo, la alta hidrofilia del sorbitol le sitúa en las cercanías del microentorno del catalizador, de manera que cuando se trabaja en medios orgánicos puede formar enlaces de hidrógeno con la proteína y actuar como *mimético* del agua. Por eso, si aumenta su concentración,

¹²⁸ Khmelnsky, Y.L.; Welch, S.H.; Clark, D.S. y Dordick, J.S. (1994) *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 2647-2648.

¹²⁹ Lozano, P.; Combes, D. E Iborra, J.L. (1994) *J. Biotechnol.*, **35**, 9-18.

¹³⁰ De Diego, T. (1998) *Tesis Doctoral*. Universidad de Murcia.

¹³¹ Gekko, K.; Timasheff, S.N. (1981) *Biochemistry*, **20**, 4677.

aumenta su interacción con el microentorno de la enzima, provocando la retirada de moléculas de agua, alterando la monocapa que es esencial para la estructura proteica y rompiendo interacciones hidrofóbicas intramoleculares para finalmente inactivar a la proteína. En consecuencia, reduce el contenido de agua libre en el microentorno y puede llegar a actuar como *depresor* de a_w . Por esta razón es conveniente trabajar a bajos valores de a_w .¹³² Además estos autores comprobaron el aumento de termoestabilidad del biocatalizador, debido a la inmovilización de las moléculas de agua, más que a la rigidificación de la proteína, confirmando que la concentración óptima del aditivo depende de la temperatura de reacción. Esta estabilización frente a la desactivación térmica también fue comprobada por Cioci y Lavecchia¹³³ al investigar con Ig G-humana en presencia de sorbitol.

La presencia de sorbitol también fue ensayada por Yamane y col.¹³⁴ comprobando que puede aumentar la velocidad de una esterificación, teniendo en cuenta que la concentración óptima de agua se altera cuando estos aditivos están presentes en el medio de reacción.

En esta misma línea Adlercreutz¹³⁵ presenta un interesante trabajo en el que adsorbe α -quimotripsina (α -CT) ó alcohol dehidrogenasa de hígado de caballo (HLADH) sobre celite y realiza dos reacciones test como son la transesterificación del ester etílico de la N-acetilfenilalanina con butanol y la reducción de ciclohexanona a ciclohexanol, respectivamente. La reacción la realiza en medios orgánicos y preequilibrando a diferentes valores iniciales de a_w ,

¹³² De Diego, T.; Lozano, P.; Níguez, M.J. e Iborra, J.L. (1998). En *Stability and Stabilization*, 411-416. Ed.: Ballesteros, A.; Plou, F.; Iborra, J.L. y Halling, P.J. Elsevier Sc. B.V.

¹³³ Cioci, F. y Lavecchia, R. (1998) *Biotechnol. Tech.*, **12(11)**, 855-858.

¹³⁴ Yamane, T.; Ichiyu, T.; Nagata, M.; Ueno, A. y Shimizu, S. (1990) *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 1063-1069.

¹³⁵ Adlercreutz, P. (1991) *Eur. J. Biochem.*, **199**, 609-614.

obteniendo la máxima actividad para valores de $a_w \geq 0,9$. Seguidamente añade sorbitol a estos preparados, en distintos porcentajes, y repite las reacciones a distintos valores de a_w . En este caso la reacción de alcoholisis de ésteres catalizada por α -CT aumenta, disminuyendo la reacción de hidrólisis. Esto equivale a decir que el máximo de actividad se obtiene ahora preequilibrando la α -CT/celite a $0,2 < a_w < 0,4$ y no a $0,9$ como ocurría sin el aditivo. Esto indica que el sorbitol asume el papel del agua en el catalizador inmovilizado favoreciendo su actividad catalítica.

Para el caso de la reducción catalizada por HLADH, donde el agua no sería un reactivo que diera una reacción parásita como en el caso de α -CT/celite, el sorbitol aumenta la actividad del catalizador HLADH/celite a $a_w < 0,8$ y la disminuye a $a_w > 0,8$.

Cuando repite el experimento con otros hidratos de carbono (D-glucosa, D-fructosa y sacarosa) se obtienen valores peores que con sorbitol pero diferentes según el hidrato de carbono empleado.

También la literatura reseña el efecto que tiene un compuesto de naturaleza poliólica como es el glicerol, que cuando se añade al medio de reacción, actúa como depresor de a_w , influyendo directamente an la actividad catalítica.^{136,137}

En la misma línea Adlercreutz¹³⁵ comprobó la activación de derivados enzimáticos provocada por la presencia de polioles en el medio de reacción y trabajando en intervalos con bajos valores de a_w .

También se ha estudiado el efecto que tienen determinados azúcares cuando se añaden al

¹³⁶ Acuna-Argüelles, M.; Gutiérrez-Rojas, M.; Viniestra-González, G. y Favela-Torres, E. (1994) *Biotechnol. Lett.*, **16(1)**, 23-8.

¹³⁷ Sawhney, I.; Patil, G.; Kumar, B. y Rao, K. (1994) *J. Food Sci. Technol.*, **31(3)**, 252-4.

¹³⁵ Adlercreutz, P. (1991) *Eur. J. Biochem.*, **199**, 609-614.

medio de reacción. Rhee y Park¹³⁸ ensayaron con azúcares como sucrosa, fructosa, oligoazúcares y sorbitol, y analizaron la influencia sobre la a_w cuando se añadían al medio de reacción. La consecuencia es que la adición de estos aditivos modifica el entorno de la enzima y que el efecto sobre el biocatalizador era diferente en cada caso.

Por otro lado, el grupo de Mattiasson¹³⁹ estudió la formación de complejos entre la quimotripsina y la etilcelulosa, que permite solubilizar la enzima sólida en disolventes hidrófobos como el tolueno; con el consecuente aumento de la actividad catalítica frente al proceso realizado con la enzima sólida cuando estaba suspendida en tolueno. Se observó un aumento de la estabilidad, que disminuía con la adición de agua y un aumento de la estabilidad térmica al formar el complejo en presencia de sales.

Para nuestro grupo de trabajo el interés de los dextranos se centró en la naturaleza polisacárida de estos polímeros de la molécula de glucosa y al hecho de que el número y calidad de los trabajos en que se estudia la unión de la enzima a dextranos de forma no covalente es reducido.

Previamente se ha comprobado que la hidrofiliación de la superficie de la proteína influye en la actividad catalítica y en la termoestabilidad de la enzima en agua.¹⁴⁰ Igualmente, cuando se trabaja en medios polares, Cabaret y col.¹⁴¹ comprobaron que la esterificación catalizada por α -quimotripsina modificada por polioles hidrofílicos, experimentaba un aumento en la velocidad de reacción, atribuido a que estos aditivos actúan reteniendo la capa de agua

¹³⁸ Rhee, Ch. y Park, J. (1993) *Chayon Chawon Nonjip*, 33, 127-35.

¹³⁹ Otamiri, M.; Adlercreutz, P. y Mattiasson, B. (1992) *Biocatalysis*, 6, 291-305.

¹⁴⁰ Mozhaev, V.V.; Melik-Nubarov, N.S. y Shikshinis, S. (1990) *Biocatalysis*, 3, 189-196.

¹⁴¹ Cabaret, D.; Bourcier, S.; Maillot, S. y Wakselman, M. (1992) *Biocatalysis*, 6, 191-199.

esencial alrededor de la proteína en presencia de estos disolventes hidrofílicos.

De ahí que basándonos en estos resultados, nuestro grupo de trabajo se haya decidido a realizar un exhaustivo estudio de la influencia de los dextranos de diferente peso molecular unidos no covalentemente a preparaciones enzimáticas; ensayando con diferentes grados de modificación y distintas cantidades de agua en el medio.

Por otro lado, y al margen del área de la Biotecnología, los dextranos juegan un importante papel en el campo de la Medicina y la Farmacología.

Un ejemplo es el uso de la fracción de 70 KDa de peso molecular para restablecer y mantener el volumen sanguíneo en el tratamiento de shock y hemorragias. La fracción de 40 KDa se emplea para mejorar el flujo sanguíneo en capilares y en el tratamiento de oclusión vascular. Además el riesgo de efectos secundarios y reacciones adversas es muy reducido.¹⁴²

Los dextranos poseen una serie de propiedades que les facilita ser empleados como portadores de fármacos, tales como: carecen de toxicidad intrínseca, no se acumulan en el organismo, tienen un gran número de grupos funcionales que les facilita su unión a la molécula farmacológicamente activa, tienen alta solubilidad en agua, que se mantiene a lo largo del tiempo que dura su incorporación con el ligando y protege al fármaco conjugado de la biodegradación.¹⁴³

¹⁴² Larsen C. (1989) *Advanced drug delivery reviews*, 3, 103-154.

¹⁴³ Holmberg, A.R. (1995) *Tesis Doctoral*, Universidad de Uppsala.

1.6.3. Modificación covalente del microentorno.

La modificación covalente de la superficie de la proteína produce una alteración del microentorno de la enzima y en especial de su grado de hidratación. Esto se debe a que estos procesos actúan modificando grupos polares de la superficie uniéndose estos a polímeros de distinto tipo. Los efectos sobre actividad y estabilidad dependen de la naturaleza química del agente empleado.¹⁴⁴

En su momento Klibanov¹⁴⁵ ya confirmó que la rigidificación de la estructura de la proteína nativa conducía a un aumento de la estabilidad, particularmente la térmica.

Una de las metodologías más empleadas ha sido la unión a monometoxi-polietilenglicol (PEG) de la lipasa de *Candida rugosa*^{146,147,148} como de otras enzimas como tripsina¹⁴⁹ y α -quimotripsina.^{150,151} El carácter anfifílico del PEG afecta al microentorno de la enzima y a sus propiedades de solubilidad en medios orgánicos.¹⁵²

Como alternativa al empleo de un soporte anfifílico se encuentra el uso de polisacáridos.

¹⁴⁴ Nascimento, A.E. y Campos-Takaki, G.M. (1994) *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **49**, 93-99.

¹⁴⁵ Klibanov, A.M. (1979) *Anal. Biochem.*, **93**, 1.

¹⁴⁶ Calvo, M.V.; Plou, F.J.; Pastor, E. y Ballesteros, A. (1995) *Biotechnol. Lett.*, **17**, 171-176.

¹⁴⁷ Hernáiz, M.J.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1997) *Biotechnol. Bioeng.*, **55**, 252-260.

¹⁴⁸ Hernáiz, M.J.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1996) *Biotechnol. Tech.*, **10**, 917-922.

¹⁴⁹ Gaertner, H.F. y Puigserver, A.J. (1992) *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 150-155.

¹⁵⁰ Domínguez, A.; Cabezas, N.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1995) *Tetrahedron*, **51**, 1827-1844.

¹⁵¹ Ljunger, G.; Adlercreutz, P. y Mattiasson, B. (1993) *Biocatalysis*, **7**, 279-288.

¹⁵² Sinisterra, J.V. y Sánchez-Montero, J.M. (1998) *Recent Res. Devel. in Organic Chemistry*, **2**, 155-194.

Esta metodología intenta mimetizar el microentorno biológico de muchas enzimas que como en el caso de la lipasa de *Candida rugosa* son glicoproteínas, en las que un medio glicosídico desempeña un importante papel aumentando la viscosidad de la solución, la resistencia al ataque proteolítico, la estabilidad, etc.¹⁵³

En esta línea, aparece el trabajo de Krysteva y col.¹⁵⁴ que consiste en la activación de una matriz de celulosa con periodato sódico y urea. Los derivados de urea obtenidos reaccionan fácilmente con el formaldehído dando lugar a grupos fuertemente reactivos para una consistente condensación con los residuos amino de las proteínas. La modificación provocó una mejora de la estabilidad en las enzimas ensayadas. La misma metodología fue repetida empleando dextrano,¹⁵⁵ provocando en consecuencia un aumento de la termoestabilidad y resistencia a los desnaturalizantes que atacaban a la enzima ensayada, en este caso la quimotripsina.

Por otro lado, la activación de la molécula de dextrano también puede hacerse por otros compuestos como:

- NaBH₄, BH₃CNNa, (CH₃)₂NBH₃¹⁵⁶
- 1,1'-carbonil imidazol¹⁵⁷
- epíclorhidrina¹⁵⁸

¹⁵³ Sharon, N. (1984) *TIBS*, **9**, 198.

¹⁵⁴ Krysteva, M.A.; Blagov, S.R. y Sokolov, T.T. (1984) *J. Appl. Biochem.*, **6**, 367-373.

¹⁵⁵ Krysteva, M.A. y Zlateva, T.P. (1988) *Biotechnol. and Appl. Biochem.*, **10**, 124-130.

¹⁵⁶ Germain, P.; Slagmolen, T. y Crichton, R.R. (1989) *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 563-569.

¹⁵⁷ Ibrahim, M.; Hubert, P.; Dellacherie, E.; Magdalou, J.; Muller, J. y Siest, G. (1985) *Enzyme Microb. Technol.*, **7**, 66-72.

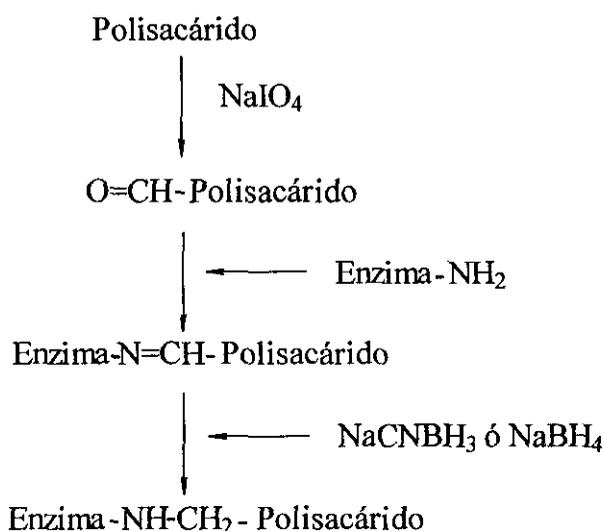
¹⁵⁸ Lowe, C.R. y Dean, P.D.G. (1974) En *Affinity Chromatography*. pág:272. Wiley, N.Y.

Existen antecedentes del aumento de estabilidad que experimenta una proteína cuando se une a un polisacárido previamente oxidado con periodato en presencia de un agente reductor.^{159,160,161,162} Este aumento de estabilidad está en función de:

- i) número de uniones covalentes enzima-polisacárido
- ii) número de uniones reversibles, como la bases de Schiff.

La primera consecuencia que se extrae de la unión a polisacáridos es un aumento de la estabilidad térmica, tal y como describen Germain y col.¹⁶² Estos autores unen pululanasa a amilosa previamente oxidada con periodato según el esquema de reacción tradicional (ver Esquema I.4).

Esquema I.4. Diseño de la reacción de unión covalente de una azúcar a una enzima.



¹⁵⁹ Lenders, J.P. y Crichton, R.R. (1984) *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1343.

¹⁶⁰ Lenders, J.P.; Germain, P. y Crichton, R.R. (1985) *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 572.

¹⁶¹ Germain, P.; Makaren, J.S. y Crichton, R.R. (1988) *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 249.

¹⁶² Germain, P. y Crichton, R.R. (1988) *J. Chem. Tech. Biotech.*, **41**, 297.

Estos autores observan que la hidrólisis de pululano a maltotriosa, catalizada por la enzima unida a amilosa puede ocurrir a unos 10 °C por encima del valor normal de hidrólisis (30 °C) lo cual atribuyen a un aumento de la rigidez molecular de la proteína que la hacen más resistente a la desactivación por choque con moléculas de agua.

Pero además es importante conocer qué ocurre cuando en vez de hidratos de carbono sencillos se usan polisacáridos. El modelo más utilizado es la molécula de dextrano, dada su regularidad y que es comercialmente inaccesible con diferentes pesos moleculares.

La unión de la proteína al dextrano se realiza a través de los grupos ϵ -NH₂ de las lisinas obteniéndose, en general, derivados más estables frente a la desnaturalización térmica y algo menos activos que la enzima nativa.^{163,161} Ello se debe a la reducción de agua en el microentorno de la proteína modificada, respecto al caso de la enzima nativa.

Germain y col.¹⁶¹ estudiaron la relación entre estabilización y la rigidificación de la estructura terciaria de una enzima. Para ello emplearon la celobiasa acoplada a un dextrano oxidado con peryodato por alquilación reductora con tres agentes diferentes: NaBH₄, BH₃CNNa y (CH₃)₂NBH₃. Los resultados obtenidos confirman que se produce un aumento de la termorresistencia al aumentar el número de lisinas modificadas debido al incremento de la rigidificación de la estructura tridimensional.

Resultados similares obtienen Kobayashi y Takatsu¹⁶³ al aumentar la estabilidad de la tripsina con dextrano dialdehído y obteniendo un biocatalizador más resistente a la temperatura, pH, disolventes orgánicos, autohidrólisis y a la presencia de inhibidores. Se observa igualmente

¹⁶³ Kobayashi, M. y Takatsu, K. (1994) *Biosci. Biotech.*, **58**, 275-278.

¹⁶¹ Germain, P.; Makaren, J.S. y Crichton, R.R. (1988) *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 249-254.

una ligera disminución de la actividad específica de la enzima provocada por el impedimento estérico que produce la presencia del polímero y que dificulta el acceso de sustratos de alto peso molecular.

Con la lipasa de *Candida rugosa* fueron Basri y col.¹⁶⁴ los que emplearon la modificación química de los grupos amino de la enzima empleando aldehidos de varias longitudes de cadena y cianoborohidruros como agentes reductores. Se produjo un aumento de la actividad y estabilidad en medio orgánico directamente proporcional al grado de modificación y al peso molecular del modificador empleado. También se incrementó la termoestabilidad.

Otros trabajos relacionados incluyen el de Germain y Crichton¹⁶² que comprobaron igualmente el aumento de la termoestabilidad de la β -amilasa inmovilizada en sílica y conjugada con un dextrano oxidado con periodato, por alquilación reductora empleando CNBH_3 .

El siguiente paso en el estudio de este modelo es ver si azúcares de pequeño tamaño unidos covalentemente a las proteínas producen el mismo efecto. El modelo más simple fue abordado por Levashov y col.,¹⁶⁵ uniendo a la α -CT pura, D-glucosamina vía carbodiimida. El grado de modificación alcanzado fue de (7 ± 2) D-glucosaminas por molécula de α -CT.

El primer efecto observado fue un aumento del pI de 8,3 (α -CT) a 9,6 (α -CTC-glucosamina), debido a la presencia de grupos amino de las glucosaminas. El valor de k_{cat} y K_m de ambas enzimas en la hidrólisis de la p-nitroanilina de la N-benzoiltirosina es el mismo. Lo cual indica que la modificación covalente de la superficie no afecta al centro activo trabajando en

¹⁶⁴ Basri, M.; Ampon, K.; Wanyunnus, W.M.Z.; Razak, C.N.A. y Sallem, A.B. (1997) *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **3**, 171-176.

¹⁶² Germain, P. y Crichton, R. (1988) *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **41**, 297-315.

¹⁶⁵ Levashov, A.V.; Rariy, R.V.; Martinek, K. y Klyachko, N. (1993) *FEBS Letters*, **336**, 385-388.

medio acuoso.

Sin embargo la situación es diferente si constreñimos a los biocatalizadores en un entorno de micelas reversas, donde la cantidad de agua que rodea a la enzima es pequeña. En estas condiciones se vio que la actividad de ambas enzimas depende de la cantidad de agua que las rodeaba (es decir, del tamaño de la micela reversa). Así mientras la α -CT requería un tamaño de micela cuya cavidad interior fuera igual a la de la proteína ($w_o = 10$), las enzimas glicosiladas, necesitan mayores tamaños de micelas ($w_o \approx 20$), porque tenderán a dar dímeros e incluso trímeros. Estos agregados moleculares eran igual de activos que la α -CT pero mucho más estables.

De ello se deduce que la unión de las proteínas a hidratos de carbono es un método de estabilización de las mismas por favorecer la formación de agregados y eliminar agua del microentorno aumentando la estabilidad térmica.

Recientemente Longo y Combes¹⁶⁶ han hecho un estudio detallado sobre los efectos que sobre el microentorno de la α -CT y de la lipasa de *C. rugosa* produce la glicosilación creciente de las mismas. Estos autores constatan el aumento de la hidrofilia de la superficie de la enzima modificada al aumentar el grado de glicosilación. Así mismo, observan que en medios acuosos, k_{cat} y K_m no varían apreciablemente, pero sí lo hacen en medios orgánicos, donde un aumento en el grado de glicosilación hace disminuir las reacciones parásitas de hidrólisis de ésteres o de amidas, lo cual se atribuye a un menor contenido en agua del microentorno enzimático.

Dentro de este apartado debe considerarse la metodología de las micelas reversas,

¹⁶⁶ Longo, M.A. y Combes, D. (1997) *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2, 281-289.

ampliamente utilizada en el caso de la lipasa de *Candida rugosa*.^{167,168} En este contexto y dada la relación con nuestro trabajo citaremos el trabajo de Calvo y col.¹⁶⁹ donde estudian el efecto del dodecilsulfato sódico (SDS) y Tritón X-100 ([polietilenglicol]₁₀ terc-octilfenil éter) sobre la actividad hidrolítica de las lipasas A y B de *Candida rugosa*.

Estos autores encuentran que la lipasa B está más afectada que la lipasa A por la presencia de los tensoactivos y que en contra de lo que cabía esperar el Tritón X-100 produce más deterioro en ambas enzimas que el SDS. Ello se debe a que alteran la cantidad de agua del microentorno de las enzimas al variar el tamaño de micela (w_0). Este efecto desnaturalizante se evita modificando químicamente con PEG (monometoxi-polietilenglicol) ($P_m = 5000$) ambas isoenzimas.

Así pues, no todos los tensoactivos que se utilizan para la formación de micelas reversas pueden ser utilizados en todas las enzimas, pues dependiendo de la estructura de éstas y de la del tensoactivo, varía la cantidad de agua de la micela y con ello la actividad enzimática.

¹⁶⁷ Ayyagari, M.S. y John, V.T.(1995) *Biotechnol. Lett.*, **17**, 177-182.

¹⁶⁸ Otero, C.; Rúa, M. y Robledo, L. (1995) *FEBS Lett.*, **360**, 202-206.

¹⁶⁹ Calvo, M.V.; Plou, F.J. y Ballesteros, A. (1996) *Biocatalysis & Biotransformations*, **13**, 271-285.

2. PRODUCCIÓN DE LIPASAS POR LA LEVADURA *Candida rugosa*.

2.1. PLANTEAMIENTO GENERAL.

Las lipasas de origen microbiano usadas en Biotecnología son en general enzimas extracelulares que suelen aparecer en el medio de cultivo al final de la fase de crecimiento exponencial de la biomasa. De entre ellas, la lipasa de *Candida rugosa* quizá sea una de las más ampliamente utilizadas en Biotransformaciones debido a su elevada estereoselectividad y resistencia a los medios orgánicos una vez liofilizada. A pesar de esto, poco se conoce del mecanismo de producción de la lipasa por la levadura. Se sabe que es necesaria la presencia de una sustancia de naturaleza lipóide (triglicérido, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, detergentes tipo Tween ó Span) sólo o en presencia de otras fuentes de carbono.^{170,171} No obstante el papel del inductor no está claro.

En un trabajo reciente,⁸⁰ se ha puesto de manifiesto que el empleo de diferentes inductores como única fuente de carbono, y en diferentes porcentajes induce la producción de diferentes lipasas crudas con diferente actividad y/o enantioselectividad. No obstante, diremos que Rúa y col.¹⁷² han aislado dos isoformas denominadas Lipasa A (LCRA) y Lipasa B (LCRB) con diferentes características bioquímicas.

¹⁷⁰ Gordillo, M.A.; Montesinos, J.L.; Casas, C.; Valero, F.; Lafuente, J. y Solá, C. (1998) *Chem. Physics of Lipids*, **93**, 131-142.

¹⁷¹ Domínguez de María, P. (1998) *Tesina de Licenciatura*. Universidad Complutense de Madrid.

⁸⁰ Kramer, G.; Batenburg, L.; Derksen, J. y Cuperus, F. (1997) *J. of Mol. Catal. B: Enzymatic*, **3**, 121-125.

¹⁷² Rúa, M.; Díaz-Mouriño, T.; Fernández, V.M.; Otero, C. y Ballesteros, A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1078**, 181-189.

Estudios genéticos han identificado siete genes que expresan diferentes lipasas.¹⁷³ Este hecho abrió las puertas a pensar que los diferentes isoenzimas descritos no se debían a modificaciones postransduccionales, sino a la expresión de diferentes genes, la cual podía ser modulada por las condiciones de fermentación.¹⁷⁴ En esta línea Lotti, y col.¹⁷⁵ han demostrado recientemente que la regulación de estos genes puede hacerse en función de la fuente de carbono utilizada. Así, el empleo de glucosa como única fuente de carbono provoca la expresión de los genes de lipasa constitutiva, la cual se excreta muy lentamente y en pequeña proporción, al medio de reacción, inhibiendo la expresión de los genes adaptativos. Por el contrario, el ácido oleico permite la expresión de los genes adaptativos inhibiendo la de los genes constitutivos. En este caso se observa una gran aparición de actividad lipásica en el medio de cultivo, ya que las lipasas adaptativas parecen excretarse al medio con una gran facilidad. En este caso se ve una fuerte secreción de lipasa al principio, seguida de una acumulación intracelular de lipasa.

Esto indica que el paso limitante del proceso es el transporte de la lipasa a través de la pared celular. Durante los ensayos de crecimiento celular en *batch*, empleando ácido oleico como fuente de carbono, el transporte de la lipasa hacia el exterior es más lento que la biosíntesis de la lipasa produciéndose una acumulación intracelular de la enzima. Por el contrario, en el caso de emplear glucosa como fuente de carbono, se produce una lenta expresión de la lipasa que se excreta al medio por un proceso algo más rápido con lo que no queda lipasa intracelular. Para

¹⁷³ Lotti, M.; Granduri, R.; Fusetti, F.; Longhi, S.; Brucca, S.; Tramontano, A.; Alberghina, L. (1993) *Gene*, **1245**, 45-55.

¹⁷⁴ Lotti, M. y Alberghina, L. (1996) "*Candida rugosa*" lipase isoenzymes en *Engineering of/with lipases*, pág: 115-124. Ed. Malcata, F., Kluwer Editions. Dordrecht.

¹⁷⁵ Lotti, M.; Monticelli, S.; Montesinos, J.L.; Brocca, S.; Valero, F. y Lafuente, J. (1998) *Chemistry & Physics of Lipids*, **93**, 143-8.

confirmar este punto se han realizado experimentos de fermentación en continuo para mantener las células de cultivo en un estado metabólico estable y ácido oleico 2 g/l como inductor.¹⁷⁴ Estos estudios han demostrado que bajas velocidades de crecimiento celular (μ baja) hacen que casi toda la lipasa sintetizada sea excretada al medio. Por el contrario, altas velocidades de crecimiento (μ alta) hacen que la lipasa se acumule mayormente en el interior celular.

Por último, experimentos realizados con diferentes concentraciones de inductor (0,5-8 g ácido oleico/l) han demostrado la dependencia directa de la cantidad de lipasa intracelular con la concentración de ácido oleico.

Este mecanismo no puede generalizarse a otros microorganismos productores de lipasa. Así *Streptomyces aureus*, *S. epidermidis* y *S. hypicus* producen las lipasas en forma de pre-pro-lipasas. La pre-región tiene un péptido señal y una longitud entre 207 y 267 aminoácidos, mientras que la lipasa tiene entre 380 y 400 aminoácidos. En estos microorganismos, las lipasas son excretadas al exterior como pre-lipasas, donde una proteína extracelular específica las transforma en lipasas. El papel de la pre-región parece ser el de un chaperon intramolecular que facilita la translocación de la lipasa, además de evitar la degradación proteolítica de la lipasa.

¹⁷⁴ Lotti, M. y Alberghina, L. (1996) "*Candida rugosa*" lipase isoenzymes en *Engineering of/with lipases*, p.: 115-124. Ed. Malcata, F., Kluwer Editions. Dordrecht.

2.2. Isoformas de la lipasa de *Candida rugosa*.

Una de las características más importantes que hay que tener en cuenta al estudiar el comportamiento de la lipasa cruda de *Candida rugosa* es la aparición de múltiples isoformas de lipasas en los preparados comerciales de esta enzima. Al menos, siete genes distintos que expresan lipasas se han descrito para la *Candida rugosa* (Lipasa 1 hasta Lipasa 7), aunque sólo cinco de ellos (Lipasa 1 a Lipasa 5) han sido caracterizados completamente.¹⁷⁴ De estos cinco genes, sólo se han identificado tres: Lipasa 1, Lipasa 2 y Lipasa 3, en los preparados comerciales de la enzima.

Tabla I.6. Propiedades de las isoenzimas de la lipasa de *Candida rugosa*.

Proteína	Peso molecular ^a	pI	Glicosilación	Secuencia N-terminal ^b
a) Proteínas deducidas a partir de secuencias de nucleótidos.				
LIP 1	57223	4,5	3 sitios	APTPTLANGD
LIP 2	57744	4,9	1	APTATLANGD
LIP 3	57291	5,1	3	APTAKLANGD
LIP 4	57051	5,7	1	APTATLANGD
LIP 5	56957	5,5	3	APTATLANGD
b) proteínas purificadas de preparaciones comerciales.				
LIP A	60000	5,5	8±3%	APTAKLANGD
LIP B	60000	4,8	3,6±0,8%	APTATLANGD
	“	4,84	“	“
	“	4,95	“	“
	“	5,04	“	“

^a Referido al peso molecular de proteínas no glicosiladas. ^b A: Alanina; P: Prolina; T: Treonina; L: Leucina; N: Asparragina; G: Glicina; D: Aspartato; K: Lisina.

¹⁷⁴ Lotti, M. y Alberghina, L. (1996) "*Candida rugosa*" lipase isoenzymes en *Engineering off/with lipases*. pág. 115-124. Malcata, F. Ed., Kluwer Editions. Dordrecht.

A partir de la secuencia genética se ha elaborado la secuencia aminoacídica teórica de las diferentes isoenzimas. La secuencia N-terminal de los cinco genes hasta ahora identificados se indica en la Tabla I.6.

Las distintas secuencias aminoacídicas presentan un 84 % de similitud con zonas altamente conservadas que intervienen en el plegamiento y función catalítica de la lipasa.¹⁷³

El cálculo teórico del peso molecular de la enzima, y de su punto isoeléctrico, así como el número de puntos de glicosilación aparecen en la Tabla I.7, siendo los puntos de glicosilación: Asparagina 291, 316 y 351. De ellos, la Asn 351 se encuentra glicosilada en todas las isoenzimas, y parece estabilizar esta cadena de polisacáridos de estructura activa con la tapadera abierta. El sitio Asn 291, es el que se glicosida con más dificultad, y después el Asn 316.

2.3. Purificación de las isoformas presentes en la lipasa cruda de *Candida rugosa*.

Aunque hay descritas en la bibliografía varios trabajos de purificación de la lipasa de *Candida rugosa*, solamente el publicado recientemente por Lotti y col.¹⁷⁵ ha significado un avance significativo en lo que se refiere a la relación de las condiciones de cultivo y de la fisiología de la levadura con el perfil lipásico/esterásico secretado por el microorganismo.

Dado que en muchas ocasiones las lipasas se presentan en forma de agregados moleculares o asociadas a otras moléculas,¹⁷⁶ además de que las isoformas tienen un diferente

¹⁷³ Lotti, M.; Granduri, R.; Fusetti, F.; Longhi, S.; Brucca, S.; Tramontano, A.; Alberghina, L. (1993) *Gene*, **1245**, 45-55.

¹⁷⁵ Lotti, M.; Monticelli, S.; Montesinos, J.L.; Brocca, S.; Valero, F. y Lafuente, J. (1998) *Chemistry & Physics of Lipids*, **93**, 143-8.

¹⁷⁶ Shaw, J.F. y Chang, C.H. (1989) *Biotechnol. Lett.*, **11**, 779-784.

grado de glicosilación debido a las condiciones de fermentación, los resultados de purificación de isoformas son muy dispares. Dado el elevado número de trabajos, sólo nos centraremos en aquellos que han identificado el tipo de isoforma aislada (Tabla I.7):

Tabla I.7. Resultados obtenidos por diferentes grupos en la purificación de la lipasa comercial.

	Lipasa	Pm	pI	% glicosidación
Rúa y col. ¹⁷²	Lip 1/B	62 KDa	4,8	3,6
Rúa y col. ¹⁷²	Lip 3/A	64 KDa	5,5	8
Grochulski y col. ¹⁷⁷	Lip 1	60 KDa	-	-
Diczfalusy y col. ¹⁷⁸	Lip 1	60 KDa	-	5
Diczfalusy y col. ¹⁷⁸	Lip 2	58 KDa	-	1,5

En resumen podemos decir, a la luz de la bibliografía más reciente:

1. La Lipasa A purificada por Rúa y col.¹⁷² corresponde a la Lipasa 3 según la secuencia N-terminal, con un grado de glicosidación elevado.
2. La Lipasa B, mayoritaria en el preparado de Sigma, según Rúa y col.,¹⁷² puede corresponder a la Lipasa 1. Esta lipasa posee siempre un grado de glicosidación mucho menor que la lipasa minoritaria.
3. De la lipasa comercial se aíslan dos isoenzimas, la mayoritaria que corresponde al gen Lip 1, mientras que la minoritaria se asocia al gen Lip 3; si bien, Diczfalusy y col.¹⁷⁸ la asocian al gen Lip 2.

¹⁷² Rúa, M.; Díaz-Mouriño, T.; Fernández, V.M.; Otero, C. y Ballesteros, A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1078**, 181-189.

¹⁷⁷ Grochulski, P.; Li, Y.; Schrag, J.D.; Douthillier, F.; Schith, P.; Harrison, D.; Rubin, B. y Cyler, M. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 12843-7.

¹⁷⁸ Diczfalusy, M.A.; Hellman, U. y Alexon, S.E.H. (1997) *Archiv. Biochem. Biophys.*, **348**, 1-8.

4. Los pesos moleculares y puntos isoelectricos experimentales difieren de los calculados teóricamente.

5. Hay una gran heterogeneidad en el grado de glicosidación, que dependen del lote estudiado y del inductor empleado.¹⁷⁰

2.4. Actividad catalítica de las isoformas lipasa A y lipasa B de *Candida rugosa*.

Dado que ambas isoformas lipasa A (Lip 3) y lipasa B (Lip 1) poseen un 84 % de homología como se comentó anteriormente, cabe esperar que ambas presentaran diferencias estructurales que se traducirían en diferencias en su capacidad como catalizadores.

La primera diferencia surge en su estabilidad relativa frente a diversos macroentornos. Así en agua a 50 °C¹⁷⁹ ambas lipasas son menos estables que la lipasa comercial, siendo la lipasa A ligeramente más estable como se deduce del tiempo de vida media:

Tabla I.8. Estabilidad térmica frente al agua de la lipasa comercial y sus isoformas.

Lipasa	$t^{1/2}$ (h)	k_d (h ⁻¹)
LCRC	0,5	1,3
LA	0,28	2,38
LB	0,23	2,86

No obstante, en presencia de tensoactivos como el dodecil sulfato sódico (SDS)¹⁶⁹ la

¹⁷⁰ Gordillo, M.A.; Montesinos, J.L.; Casas, C.; Valero, F.; Lafuente, J. y Solá, C. (1998) *Chem. Physics of Lipids*, **93**, 131-142.

¹⁷⁹ Moreno, J.M. (1994) *Tesis Doctoral*, Universidad Complutense de Madrid.

¹⁶⁹ Calvo, M.V.; Plou, F.J. y Ballesteros, A. (1996) *Biocatal. & Biotransformations*, **13**, 271-285.

Lipasa B es mucho menos estable que la Lipasa A (Tabla I.9).

Detergentes de estructura de polietilenglicol como el Triton X-100, desactivan rápidamente a la LB (60 % inactivación en presencia de 2 % de tensoactivo), mientras que la LA es más resistente.

Por otro lado, Otero y col.¹⁶⁸ estudiaron la estabilidad de ambas isoenzimas en micelas reversas de AOT (sulfosuccinato sódico) y de Bis (2-etil-hexilo) con diferentes valores de [agua]/[tensoactivo] ($w_o = 5, 12,5$ y 30). Estos autores observan que la estabilidad de la LA aumenta al hacerlo w_o , mientras que ocurre lo contrario para la LB.

Tabla I.9. Desactivación de las isoenzimas nativas LA y LB en presencia de SDS. Tª 25 °C.¹⁶⁹

	0,04 % SDS		0,2 % SDS		0,5 % SDS	
	k_d (h ⁻¹)	$t^{1/2}$ (min)	k_d (h ⁻¹)	$t^{1/2}$ (min)	k_d (h ⁻¹)	$t^{1/2}$ (min)
LA	-	-	2,7	15	4,55	9
LB	2,6	16	> 9,0	< 5	-	-

Todos estos resultados se pueden explicar en función de la interacción enzima-tensoactivo. La LB que se desactiva rápidamente por la presencia de tensoactivos en el medio es estable en micelas reversas del tamaño de la proteína, mientras que la LA, no es tan sensible a la presencia de tensoactivos, es estable en grandes micelas donde se une a la bicapa de tensoactivo, como han demostrado los autores mediante la técnica de fluorescencia.

Estos resultados indican que la LA, más lípido según Rúa y col.,¹⁷² es más estable en

¹⁶⁸ Otero, C.; Rúa, M. y Robledo, L. (1995) *FEBS Letters*, **360**, 202-206.

¹⁶⁹ Calvo, M.V.; Plou, F.J. y Ballesteros, A. (1996) *Biocatal. & Biotransformations*, **13**, 271-285.

¹⁷² Rúa, M.; Díaz-Mouriño, T.; Fernández, V.M.; Otero, C. y Ballesteros, A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1078**, 181-189.

medios acuosos que la LB (más hidrófila). Es por ello por lo que se suelen obtener mayores efectos estabilizantes en la inmovilización de la LA, v.g. en microgeles de resina acrílica¹⁸⁰ que protegen a la enzima del efecto desnaturalizante del medio.

Por el contrario, en inmovilizaciones covalentes en que la enzima está en la superficie del soporte expuesta al medio acuoso, el efecto estabilizador es el mismo para ambas isoenzimas, como demostraron Moreno y col.¹⁸¹ al inmovilizar ambas isoenzimas sobre agarosa vía cloruro de tosilo o sobre sílice vía triclorotriazina. En ambos casos la vida media aumentaba de 0,28 h LA y 0,23 h LB ($T^a = 50\text{ }^\circ\text{C}$) a 5 y 4 h respectivamente, en ambos tipos de inmovilización.

Por lo que se refiere a la estabilidad en medio orgánico (inmiscible en agua) a $50\text{ }^\circ\text{C}$, la LB (hidrófila) es más estable que la LA (hidrófoba) tal y como cabía esperar¹⁴⁸ (Tabla I.10):

Tabla I.10. Estabilidad térmica frente a isooctano de las isoformas de la preparación comercial.

	$k_d\text{ (h}^{-1}\text{)}$	$t^{1/2}\text{ (min)}$
LA	3	0,25
LB	0,7	0,9

Es por eso por lo que la modificación química de estas lipasas con compuestos anfifílicos como el polietilenglicol estabilizan más ahora a la LA ($t^{1/2} = 64\text{ h}$) que a la LB ($t^{1/2} = 2,1\text{ h}$).

La técnica de fluorescencia se ha aplicado en el estudio estructural de proteínas al ser una técnica muy sensible para detectar la unión de sustratos a la proteína,¹⁸² reacciones de

¹⁸⁰ Otero, C.; Robledo, L. y Alcántara, A. (1995) *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **1**, 23-28.

¹⁸¹ Moreno, J.M.; Hernáiz, M.J.; Sánchez-Montero, J.M.; Sinisterra, J.V.; Bustos, M.T.; Sánchez, M.E. y Bello, J.F. (1997) *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2**, 177-184.

¹⁴⁸ Hernáiz, M.J.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1996) *Biotechnol. Tech.*, **10**, 917-922.

¹⁸² Demchenko, A.P. (1985) *FEBS Lett.*, **182**, 99-102.

asociación¹⁸³ o procesos de desnaturalización.¹⁸⁴ Mediante esta técnica, Hernáiz¹⁸⁵ ha puesto de manifiesto que la Lipasa B es más sensible a la degradación por irradiación con luz UV que la Lipasa A, así como la interacción entre diversos cationes iónicos y ambas lipasas. Esta interacción es diferente según la isoenzima de que se trate.

Como cabía esperar estas diferencias estructurales entre ambas isoformas, se traducen en diferente capacidad catalítica y/o especificidad. En general la Lipasa B es más activa en la hidrólisis de triglicéridos de cadena larga¹⁶⁹ que la Lipasa A y de ácidos de estructura de (*R,S*) 2-aril propanóicos,¹⁷⁹ si bien ambas son estereoselectivas. La estereoselectividad crece a medida que aumenta el tamaño del anillo aromático del sustrato, siendo la Lipasa B más estereoselectiva que la Lipasa A.

Estos resultados coinciden con la tradicional asignación a la lipasa de *Candida rugosa* de un centro activo con estructura de túnel largo de 22 Å¹⁸⁶ y dado que la Lip 1 es la misma que la Lipasa B, que es el componente mayoritario de la lipasa comercial de *Candida rugosa*, podemos pensar que Pleiss y col.¹⁸⁶ están refiriéndose a la Lipasa B.

Recientemente Otero y col.,¹⁸⁷ empleando la técnica de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) han indicado que ambas isoenzimas poseen una larga cavidad en la zona de

¹⁸³ Mills, J.S.; Walsh, M.P.; Nemcek, K. y Johnson, J.D. (1988) *Biochemistry*, **27**, 991.

¹⁸⁴ Chang, G.G. y Lee, H.J. (1984) *J. Biochem. Biophys. Met.*, **9**, 35.

¹⁸⁵ Hernáiz, M.J., (1996) *Tesis Doctoral*. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

¹⁶⁹ Calvo, M.V.; Plou, F.J. y Ballesteros, A. (1996) *Biocatal. & Biotransformations*, **13**, 271-285.

¹⁷⁹ Moreno, J.M. (1994) *Tesis Doctoral*, Universidad Complutense de Madrid.

¹⁸⁶ Pleiss, J.; Fisher, M. y Schmid, R.D. (1998) *Chemistry & Physics of Lipids*, **93**, 67-80.

¹⁸⁷ Otero, C.; Castro, R.; Screa, J. y Caldararu, H. (1998) *J. Phys. Chem. B*, **102**, 8611-8.

reconocimiento del ácido carboxílico, si bien la Lipasa A posee una zona con fuerte impedimento estérico a cinco enlaces del grupo COOH, lo cual justifica que la Lipasa A reconociera mejor que la Lipasa B a sustratos no naturales con bajo impedimento estérico.

También existen diferencias en cuanto a hidrofobicidad¹⁸⁸ y actividad^{146,148}:

- muestran la misma *R*-enantiopreferencia en la hidrólisis de etil cloropropionatos¹⁸¹
- muestran la misma (*S*)-enantiopreferencia en la síntesis del ester propílico del (*R,S*) 2-(4-isobutil) fenilpropiónico.¹⁸⁵

2.5. Lipasa semipurificada de *Candida rugosa*.

En 1991 Sánchez-Montero y col.¹⁸⁹ publicaron una metodología de semipurificación muy sencilla de la lipasa comercial de *Candida rugosa*, por diálisis frente a una membrana de corte de 20 KDa. Esta enzima presentaba una menor actividad hidrolasa frente a la tributirina pero una mayor actividad en la hidrólisis de esteres de ácidos no naturales como son los ácidos 2-aril propanoicos¹⁹⁰ pero menor en la síntesis del oleato de heptilo¹⁸⁶, presentando, no obstante una

¹⁸⁸ Hernáiz, M.J.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1997) *Biotechnol. Lett.*, **19**, 303-306.

¹⁴⁶ Calvo, M.V.; Plou, F.J.; Pastor, E. y Ballesteros, A. (1995) *Biotechnol. Lett.*, **17**, 171-176.

¹⁴⁸ Hernáiz, M.J.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1996) *Biotechnol. Tech.*, **10**, 917-922.

¹⁸¹ Moreno, J.M.; Hernáiz, M.J.; Sánchez-Montero, J.M.; Sinisterra, J.V.; Bustos, T.M.; Sánchez, M.E. y Bello, J.F. (1997) *J. Mol. Catal. B. Enzymatic*, **2**, 177-184.

¹⁸⁵ Hernáiz, M.J., (1996) *Tesis Doctoral*. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

¹⁸⁹ Sánchez-Montero, J.M.; Hamon, V.; Thomas, D. y Legoy, M.D. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1078**, 341-350.

¹⁹⁰ Hernáiz, M.J.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1994) *Tetrahedron*, **50**, 10744-10760.

mayor vida media en isooctano a 50 °C (12 h),¹⁴⁷ que las lipasas comerciales (0,9 h LB y 0,25 h LA)¹⁴⁸. No obstante, la LCRS es menos estable en presencia de agua a 50 °C ($t^{1/2} = 0,38$ h) que la LCRC ($t^{1/2} = 0,5$ h) y más estable que las isoenzimas en las mismas condiciones: LA ($t^{1/2} = 0,28$ h) y LB ($t^{1/2} = 0,23$ h).¹⁷⁹

Su facilidad de preparación y la menor presencia de contaminantes la ha hecho una candidata idónea para estudios de estabilización por modificación química covalente.

¹⁴⁷ Hernáiz, M.J.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1997) *Biotechnol. Bioeng.*, **55**, 252-260.

¹⁴⁸ Hernáiz, M.J.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1996) *Biotechnol. Tech.*, **10**, 917-922.

¹⁷⁹ Moreno, J.M. (1994) *Tesis Doctoral*. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

3. Importancia de las lipasas en procesos biocatalizados.

Las lipasas son triacilglicerol hidrolasas, E.C. 3.1.1.3, que catalizan la hidrólisis de ésteres insolubles en agua como los triacilglicéridos. Actúan en un amplio rango de sustratos presentando una alta selectividad, la combinación de estas dos características las convierte en catalizadores óptimos para la síntesis orgánica.

La estructura de la proteína se establece a través de la estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, constituyendo estas últimas la estructura plegada. En el proceso de plegamiento, las cadenas laterales hidrofóbicas de aminoácidos se orientan preferentemente hacia el interior de la molécula, de esta manera se disminuye el área de la superficie en contacto con el agua y se minimiza la energía libre. Los grupos polares se orientan preferentemente hacia la superficie interaccionando con el agua. En el compacto espacio interior de la proteína el agua es excluida o está presente en forma de moléculas de agua en lugares definidos. El proceso de plegamiento genera una única superficie tridimensional de la proteína definiendo así sus dimensiones moleculares por la especificidad de cadenas laterales y un esqueleto polipeptídico.

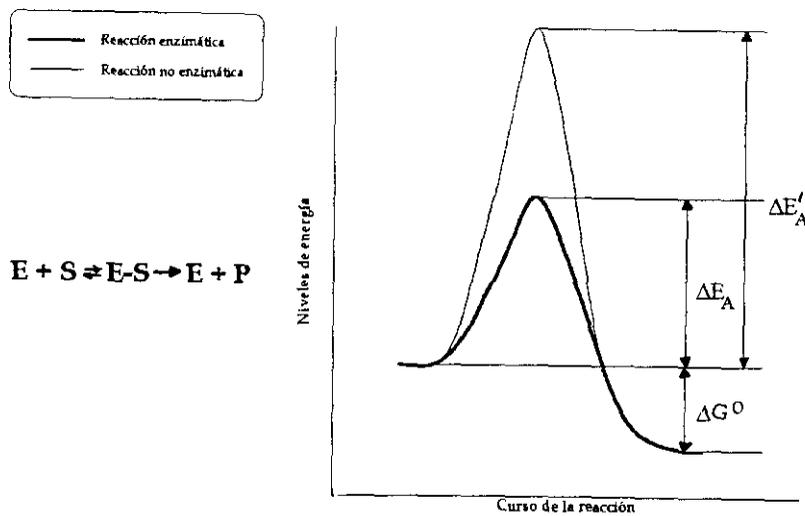
Los sustratos y su estado de transición también emplean uniones por interacciones múltiples no covalentes. Cuando la fuerza de estas uniones no covalentes está unida a la distancia y al ángulo de interacción da lugar a una unión altamente selectiva.

De esta manera la separación de dos enantiómeros es posible a través de una unión a tres puntos, o bien por medio de impedimentos estéricos que, permiten diferenciar dos estructuras similares durante la unión. Todo ello hace que el reconocimiento del sustrato sea un proceso dinámico no sólo de cara a la asociación y disociación del sustrato, sino también incluye

movimientos de la cadena polipeptídica en respuesta a la unión.

Como catalizadores las enzimas alteran la velocidad a la que se llega al equilibrio termodinámico, pero no cambian el equilibrio, esto implica que las enzimas trabajan reversiblemente. La aceleración en la velocidad de reacción lleva un descenso en la energía de activación (Figura I.8).

Figura I.8. Efecto de la catálisis enzimática sobre la energía de activación. ΔE_A es la energía de activación para una reacción catalizada por una enzima. $\Delta E'_A$ es la que corresponde a una reacción enzimática. ΔG° es la energía libre de la reacción.



Actúan en la interfase entre regiones hidrofóbicas e hidrofílicas, lo que permite que esté cerca del sustrato, aumentando el poder catalítico de la lipasa; es el denominado proceso de *activación interfacial* y se trata de una de las características que diferencian lipasas de esterasas.

El razonamiento molecular para este fenómeno está basado en que la lipasa disuelta libremente en un medio en ausencia de interfase lípido/acuosa se mantiene en un estado inactivo y una parte de la molécula de enzima está cubriendo el sitio catalítico. Por otro lado, si la enzima se pone en contacto con un sistema bifásico se produce la apertura de este centro activo.

La lipasa comercial de *Candida rugosa* (LCRC) contiene 2-11 % (p/p) de proteínas,¹⁹¹ el resto son azúcares y contaminantes. La electroforesis revela una proteína con un peso molecular de unos 63 KDa con la tinción de azul de Coomassie, pero con tinciones más sensibles, se visualizaron pequeñas cantidades de otras proteínas. Se han clonado 5 isoenzimas diferentes a partir de la levadura de *Candida rugosa*¹⁷³ con pesos moleculares similares. La LCRC utiliza un codon inusual para la serina, lo que provoca una translación incorrecta del gen en otros microorganismos. Ello implica que las muestras comerciales pueden tener más de una isoenzima.

Se han aislado diferentes lipasas de proteínas comerciales,¹⁷² la glicosilación de estas lipasas puede contribuir a estas diferencias.

Las lipasas son biocatalizadores ampliamente empleados en reacciones químicas y particularmente en reacciones de esterificación.⁴³

La LCRC, como enzima que es, requiere una pequeña cantidad de agua para mantener su estructura tridimensional en la conformación catalíticamente activa. El agua contribuye a la integridad estructural, polaridad del sitio activo y estabilidad de la proteína. Mantiene interacciones con residuos polares de la enzima evitando que interaccionen unas moléculas con otras, lo que en su caso daría lugar a una estructura conformacional incorrecta.³⁴

¹⁹¹ Weber, H.J.; Stecher, H. y Faber, K. (1995) "Some properties of commercially available crude lipase preparations". pág: 5:2.1-5:2.10. *Preparative Biotransformations*. Ed: Roberts, S.M.

¹⁷³ Lotti, M.; Grandori, R.; Fusetti, F.; Longhi, S.; Brocca, S.; Tramontano, A. y Alberghina, L. (1993) *Gene*, **124**, 45-55.

¹⁷² Rúa, M.; Díaz-Mauriño, T.; Fernández, V.; Otero, C. y Ballesteros, A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1156**, 181-189.

⁴³ Yahya, A.R.; Anderson, W.A. y Moo-Young, M. (1998) *Enzyme Microb. Technol.*, **23**, 438-450.

³⁴ Bross, J.; Visser, A.J.W.G.; Engbersen, J.; Verboom, W.; van Hoek, A. y Reinhoudt, D. (1995) *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 12657-12663.

Algunos autores sugieren que esta cantidad de agua se dispone en una monocapa rodeando la molécula de enzima, mientras que otros proponen que minúsculas cantidades estén embebidas en la molécula de enzima.^{46,192} En cualquier caso, la cantidad de agua presente en la reacción influye en la velocidad y algo menos en la enantioselectividad. En un principio este contenido en agua se optimizó midiendo a través de una titración Karl-Fischer⁴⁷ pero recientemente se ha comprobado que es a_w el mejor parámetro para determinar el contenido de agua al comparar diferentes condiciones de reacción.¹⁹³

Bell y col.¹⁹⁴ compararon la a_w y la temperatura en la relación que cada parámetro tiene con la cantidad de agua y el contenido en calor respectivamente; de esta manera, dos sistemas pueden tener la misma a_w o temperatura, pero al mismo tiempo diferir en el contenido en agua o en el de calor.

Las cantidades de agua presentes en la mezcla de reacción dependen del disolvente orgánico empleado como medio. Los disolventes polares necesitan más agua añadida que los no polares debido a que compiten con la lipasa por el agua disponible. La esterificación catalizada por LCRC tiene mejores resultados con disolventes altamente hidrófobos.¹⁹³

También ha podido modificarse la actividad catalítica de LCRC a través de procesos de

⁴⁶ Zaks, A. y Klivanov, A.M. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 8017-8021.

¹⁹² Winkler, F.K. y Gubemator, K. (1994) En: *Lipases, Their Structure, Biochemistry and Application*. p.:139-157. Cambridge. University Press, Cambridge.

⁴⁷ McMinn, J.H.; Sowa, M.J.; Charnick, S.B.; Paulaitis, M.E. (1993) *Biopolymers*, **33(8)**, 1213-24.

¹⁹³ Halling, P. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1040**, 225-228.

¹⁹⁴ Bell, G.; Halling, P.J.; Moore, B.D.; Partidge, J. y Rees, D.G. (1995) *Trends Biotechnol.*, **13**, 468-473.

inmovilización y empleo de surfactantes.^{127,195,125}

Otra de las características que convierten a la LCRC en un óptimo catalizador es su capacidad para la resolución enantioselectiva de sustratos racémicos. En esta línea la enantioselectividad de esta enzima es aprovechada para la obtención del enantiómero *S*(+) de los ácidos 2-aril propanoicos, que son una clase de antiinflamatorios no esteroídicos caracterizados por ser el *S*-enantiómero el que presenta mayor actividad farmacológica, es decir el eutómero.

La medida de la enantioselectividad viene dada por el valor de *E* o relación enantiomérica y define la capacidad de una enzima para distinguir entre dos enantiómeros. Trabajando con sustratos racémicos, el valor de *E* viene dado por la siguiente fórmula:¹⁹⁶

$$E = \frac{\ln[(1 - c)(1 - ee_{sust})]}{\ln[(1 - c)(1 + ee_{sust})]} \quad [6]$$

una reacción no selectiva tiene un *E* = 1; mientras que resoluciones con *E* > 20 son útiles para la síntesis. Altos valores de *E* (≈ 100) son menos apropiados ya que la relación enantiomérica es una función logarítmica de la pureza enantiomérica.

La resolución enantioselectiva de ácidos (*R,S*) 2-aril propiónicos catalizada por la LCRC se ha realizado a través de dos vías:

¹²⁷ Arroyo, M.; Moreno, J.M. y Sinisterra, J.V. (1993) *J. Mol. Catal.*, **83**, 261-271.

¹⁹⁵ Moreno, J.M.; Arroyo, M. y Sinisterra, J.V. En *Stability and Stabilization of enzymes*. Ed.: Van den Twell, W.; Harder, A. y Buitelaar, R.M. Elsevier Sc. Publ. B.V., Amsterdam.

¹²⁵ Sánchez, E.V.; Bello, J.F.; Roig, M.G.; Burguillo, F.J.; Moreno, J.M. y Sinisterra, J.V: (1996) *Enzyme Microb. Technol.*, **18**, 468-476.

¹⁹⁶ Sih, C.J. y Wu, S.H. (1989). *Topics in Stereochemistry*, **19**. pág.: 63-125. Ed.: Eliel, E.L. y Wilen, S.H. NY. John Wiley & Sons.

i) vía hidrólisis de varios esteres de estos ácidos^{197,198,190}

ii) vía esterificación.^{199,81}

Para aumentar la enantioselectividad de la resolución de ácidos quirales catalizada por LCRC se han empleado numerosos métodos:

- cambiando el disolvente²⁰⁰
- cambiando la temperatura²⁰¹
- cambiando el pH o transcurriendo la reacción en una microemulsión¹²¹
- añadiendo (S) 2-amino-4-metiltio-1-butanol¹²⁰²
- añadiendo Tritón X-100 como surfactante²⁰³
- uniendo residuos ε-amino de lisinas a un soporte sólido²⁰⁴
- por nitración de grupos tirosilo²⁰⁵

¹⁹⁷ Gu, Q.-H.; Chen, C.-S. y Sih, C.J. (1986) *Tetrahedron Lett.*, **27**, 1763-1766.

¹⁹⁸ Battistel, E.; Bianchi, D.; Cesti, P. y Pina, C. (1991) *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 659-664.

¹⁹⁰ Hernáiz, M.J.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1994) *Tetrahedron*, **50**, 10749-10760.

¹⁹⁹ Mustranta, A. (1992) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 61-66.

⁸¹ De la Casa, R.M.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1996) *Biotechnol. Lett.*, **18**, 19.

²⁰⁰ Miyazawa, T.; Kurita, S.; Ueji, S.; Yamada, T. y Kuwata, S. (1992) *Biotechnol. Lett.*, **14**, 941-946.

²⁰¹ Yasufuku, Y. y Ueji, S. (1997) *Bioorg. Chem.*, **25**, 88-99.

¹²¹ Hedström, G.; Backlund, M. y Slotte, J.P. (1993) *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 618-624.

²⁰² Itoh, T.; Takagi, Y. y Nishiyama, S. (1991) *J. Org. Chem.*, **56**, 1521-1524.

²⁰³ Bhaskar, R.A.; Rehman, H.; Krishnakumari, B. y Yadav, J.S. (1994) *Tetrahedron Lett.*, **35**, 2611-2614.

²⁰⁴ Sinisterra, J.V.; Llama, E.F.; Del Campo, C.; Cabezas, M.J.; Moreno, J.M. y Arroyo, M. (1994) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2**, 1333-1346.

²⁰⁵ Gu, Q.-H. y Sih, C.J. (1992) *Biocatalysis*, **6**, 115-126.

- por purificación y tratamiento de los cristales de la proteína^{206,207}
- por purificación²⁰⁸
- controlando la adición de agua.²⁰⁹

No se conoce exactamente cómo estos cambios aumentan la enantioselectividad a nivel molecular, pero existen dos posibilidades:

i) los tratamientos pueden retirar o inactivar una hidrolasa contaminante con una enantioselectividad baja u opuesta,

ii) los tratamientos pueden cambiar la conformación de la LCRC.

Se han resuelto las estructuras cristalográficas abierta y cerrada de la LCRC que difieren en la orientación de la tapadera. Lalonde y col.²⁰⁶ comprobaron que los cristales de ambas formas difieren en la enantioselectividad.

Estas dos posibilidades no se excluyen entre sí y ambos efectos pueden contribuir a la enantioselectividad.

Los enantiómeros de un compuesto bioactivo pueden causar diferentes efectos biológicos. Algunos enantiómeros presentan diferentes efectos biológicos como es el caso de los terpenos.

Los terpenos constituyen un grupo de compuestos que, en su mayoría, se encuentran en el reino vegetal; sólo unos pocos se han obtenido de otras fuentes.

Dentro de los terpenos objeto de nuestro estudio nos hemos centrado en compuestos de

²⁰⁶ Lalonde, J.J.; Govardhan, C.; Khalaf, N.; Martínez, A.G.; Visuri, K. y Margolin, A.L. (1995) *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 6845-6852.

²⁰⁷ Persichetti, R.A.; Lalonde, J.J.; Govardhan, C.P.; Khalaf, N.K. y Margolin, A.L. (1996) *Tetrahedron Lett.*, **37**, 6507-6510.

²⁰⁸ Wu, S.H.; Guo, Z.W. y Sih, C.J. (1990) *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 1990-1995.

²⁰⁹ Tsai, S.W. y Dordick, J.S. (1996) *Biotechnol. Bioeng.*, **52**, 296-300.

diferente naturaleza estructural:

- monoterpenos acíclicos: *nerol*, *geraniol*,
- monoterpenos monocíclicos: *mentol*, *isomentol* y *neomentol*,
- sesquiterpenos acíclicos: *farnesol*.

Los alcoholes terpénicos y sus ésteres constituyen uno de los componentes más importantes de los aceites esenciales, compuestos con naturaleza lipídica que son conocidos por su aroma y fragancia y están ampliamente explotados en la industria de la alimentación, cosmética, bebidas y en la industria farmacéutica. La producción de ésteres de terpenos por extracción de plantas y por fermentación es a menudo cara desde el punto de vista comercial. Además la producción a larga escala de ésteres de terpenos se realiza normalmente por procesos químicos que no son específicos y que requieren elaborados pasos de purificación. Por otro lado, la síntesis química provoca también la pérdida de propiedades organolépticas con respecto a los productos naturales.²¹⁰

Estos sustratos también se han empleado en esta Memoria para evaluar la actividad catalítica de la LCRC a través de reacciones de transesterificación.

²¹⁰ Bauer, K.; Garbe, D. y Surburg, H. (1990) *Common Fragrance and Flavor Materials* 2nd Ed., VCH Publishers, N.Y.

4. MODELIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENZIMA-SUSTRATO.

A fin de dar un paso adelante respecto a los estudios realizados anteriormente por el grupo de trabajo sobre la conformación activa de estos ácidos *S* (+) que interaccionaban con la enzima, se procedió a estudiar la interacción de la proteína obtenida del fichero del *Protein Data Bank* con el *S* y *R* ketoprofeno (ácido 2-(3'-benzoil)-fenil propanoico) empleando las metodologías de la Mecánica y la Dinámica Molecular.

4.1. Conceptos básicos.

La teoría de la modelización molecular permite al químico, entre otras posibilidades:

- 1) el refinamiento de las estructuras macromoleculares obtenidas a partir de datos de rayos-X o de RMN
- 2) la predicción de la conformación espacial de distintos biopolímeros mediante homología de la estructura primaria
- 3) el estudio de las interacciones intramoleculares e intermoleculares enzima-sustrato, fármaco-receptor, etc., con proyección al estudio de la relación estructura-actividad.

Las técnicas de simulación por ordenador son utilizadas para analizar las propiedades de los sistemas moleculares en términos de interacciones a nivel atómico. Para poder realizar la simulación del sistema es necesario conocer las interacciones existentes entre los átomos implicados en la misma, es decir, el campo de fuerza interatómico que nos conduzca a la predicción lo más precisa posible de las propiedades moleculares conocidas del sistema. Una vez

conocido este campo de fuerza, será posible predecir propiedades moleculares desconocidas o inaccesibles por métodos experimentales, así como estructuras y propiedades de proteínas y ácidos nucleicos debidas a mutaciones (modificaciones locales de algunos pocos aminoácidos o nucleótidos) y estructuras homólogas, en las cuales sólo un pequeño porcentaje de residuos se conserva pero presentan el mismo tipo de plegamientos. Además nos permitirá conocer algunas propiedades funcionales como por ejemplo, la estabilidad de estas macromoléculas con respecto a cambios en el pH, temperatura y su especificidad o capacidad de enlace.

4.2. Definición de campos de fuerza y funciones de energía potencial.

La determinación de las estructuras moleculares por utilización de una metodología estática (minimización de energía) o una metodología dinámica (dinámica molecular) se basa en la búsqueda de un mínimo global de la función de energía potencial del sistema en función de las posiciones atómicas. La superficie de energía potencial indica la estabilidad relativa de las diferentes estructuras estables o metaestables. Sólo en el caso de moléculas pequeñas es posible aplicar los cálculos aproximados de mecánica cuántica para obtener las superficies de energía potencial. En el caso de proteínas y ácidos nucleicos, el gran número de átomos hace imposible la resolución de las ecuaciones de la mecánica cuántica para la obtención de la función de energía potencial para lo cual se han de hacer una serie de aproximaciones.

El elemento esencial de la simulación es pues el conocimiento del potencial de interacción de las partículas, a partir del cual es posible calcular las fuerzas y las ecuaciones de movimiento que gobiernan la dinámica de las moléculas. Como el potencial utilizado en las simulaciones es

aproximado, éste puede ser modificado por el usuario según el problema a tratar. Cuanto más detallada sea la función de energía potencial empleada, más se aproximará la variación del potencial a la función de energía potencial real.

En el caso de proteínas y ácidos nucleicos la función de energía potencial (V_r) es una suma de términos del tipo:

$$V_r = V_{\text{enlace}} + V_{\text{ángulos}} + V_{\text{diedros}} + V_{\text{Imp}} + V_{\text{vdw}} + V_{\text{Coulomb}} + V_{\text{dc}} \quad [7]$$

donde V_{enlace} , $V_{\text{ángulos}}$, V_{diedros} , etc. significa la energía que posee el conformero indicado en función de los parámetros estándar. La función de energía potencial (V_r) es función del conjunto de coordenadas cartesianas, r , que especifica la posición de todos los átomos $V = V_r = V(r_1, r_2, \dots, r_n)$ y a partir de la cual se calculan las coordenadas internas: distancias de enlace, ángulos de enlace, ángulos diedros, distancias entre átomos, etc. en cada conformero.

El primer término de la ecuación [7] corresponde a la tensión del enlace (desplazamiento instantáneo de la longitud de enlace ideal) y viene representado por la ecuación de potencial armónico simple (ley de Hooke). Las expresiones correspondientes a la fuerza y la energía son:

$$F = -\nabla V = -K_{\text{enl}} (r - r_0) \quad [8]$$

$$V_{(r)} = \frac{1}{2} (K_{\text{enl}}(r - r_0)^2) \quad [9]$$

donde F es la fuerza recuperadora del enlace necesaria para restablecer la posición de equilibrio, K_{enl} es la constante recuperadora del enlace deformado, r es la distancia interatómica deformada, r_0 es la distancia interatómica en la situación de equilibrio, y V_r es la energía de enlace.

El segundo término de la ecuación [7] representa la flexión del enlace (alteración de los ángulos de enlace) y viene descrito de forma similar por un potencial armónico simple. La expresión de la energía de flexión de enlace es:

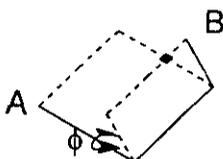
$$V_{(\theta)} = \frac{1}{2} (K_{\text{bond}} (\theta - \theta_0)^2) \quad [10]$$

donde K_{bond} es la constante recuperadora del ángulo de enlace; θ es el valor del ángulo de enlace y θ_0 es el ángulo de enlace en la situación de equilibrio.

El tercer término de la ecuación [7] describe la torsión de enlace (rotación del enlace). En este caso el potencial utilizado es una función periódica que suele ser del tipo coseno o suma de funciones coseno.

$$V_{(\phi)} = \frac{1}{2} (K_{\text{die}} (1 + \cos(n \phi - \phi_0))) \quad [11]$$

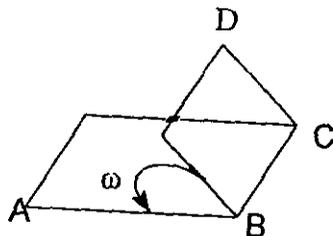
donde ϕ es el valor del ángulo diedro; n es un número natural y K_{die} es la constante recuperadora del ángulo diedro.



El cuarto término de la ecuación [7] se conoce con el nombre de torsión impropia o torsión fuera del plano y representa la interacción que fuerza a un determinado átomo a mantenerse a una determinada distancia del plano formado por los otros tres. Se suele definir como el ángulo diedro entre el plano formado por los tres primeros átomos que permanecen en el plano (dos de ellos) y el que está fuera del plano.

$$V_{\text{imp}}(\omega) = \frac{1}{2} (K_{\omega} (\omega - \omega_0)^2) \quad [12]$$

Este término se incluye para mantener la quiralidad de un átomo pesado tetraédrico (por ejemplo, un carbono alfa sin hidrógenos explícitos) o la planaridad de ciertos átomos planos (por ejemplo, el carbono del grupo carbonilo).



El quinto término de la ecuación [7] incluye las interacciones no enlazantes correspondientes a fuerzas de Van der Waals. El potencial utilizado para describir estas interacciones suele ser del tipo Lennard-Jones.

$$V_{vdw} = \epsilon [(r_0/r)^{12} - 2(r_0/r)^6] \quad [13]$$

donde r_0 es la distancia de equilibrio relacionada con los ángulos de Van der Waals; r es la distancia y ϵ es la profundidad del plano de potencial relacionado con la polarización.

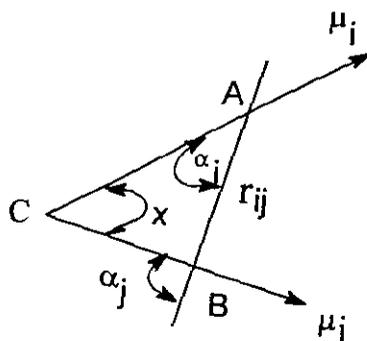
El siguiente término de la ecuación [7] tiene en cuenta las interacciones no enlazantes de tipo electrostático. Viene representado por la ecuación de Coulomb.

$$V_{(r)} = (q_1 \cdot q_2 / Dr) \quad [14]$$

donde D es la constante dieléctrica del medio y r es la distancia entre las dos cargas. Sin embargo, en moléculas no cargadas pero polares como las proteínas, lo apropiado es utilizar la interacción dipolo-dipolo que se calcula mediante la función FEANS [15].

$$V_D = \frac{\mu_1 \cdot \mu_2}{Dr_{ij}} (\cos \chi - 3 \cos \alpha_i \cdot \cos \alpha_{ji}) \quad [15]$$

en función de la constante dieléctrica D , del ángulo χ que forman los vectores de los dipolos, de los ángulos que forman los vectores de los dipolos con la recta que une los dos átomos finales del enlace C-A y C-B y la distancia entre ambos A y B.



El último término de la ecuación [7] considera las restricciones experimentales de distancias y ángulos diedros obtenidas a partir de rayos X y RMN.^{211,212} Este término se incluye únicamente en el caso de que se realicen cálculos restringidos tanto de minimización de energía como de Dinámica Molecular. Normalmente viene representado por un potencial armónico del tipo:

$$V_{(d)} = \frac{1}{2} (K_{dc}(d_{ij}-d_{oij})^2) \quad [16]$$

para restricciones de distancias. De forma similar se pueden incluir las restricciones correspondientes a ángulos diedros obtenidos a partir de las constantes de acoplamiento.

$$V_{(\phi)} = \frac{1}{2} (K_{(\phi)} (\phi - \phi_{oi})^2) \quad [17]$$

En algunos casos el potencial incluye además las interacciones por puentes de hidrógeno²¹³ e interacciones agua-agua.^{214,215}

²¹¹ Bruger, A.T.; Clore, G.M.; Gronenborn, A.M. y Karplus, M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3801.

²¹² Wüthrich, K. (1989) *Accts. Chem. Res.*, **22**, 36.

²¹³ Brooks, B.R.; Bruccoleri, R.E.; Olafson, B.D.; States, D.J.; Swaminathan, S. y Karplus, M. (1983) *J. Comp. Chem.*, **4**, 187.

²¹⁴ Stillinger, F.H. y Rahman, A. (1974) *J. Chem. Phys.*, **60**, 1545.

²¹⁵ Barnes, P.; Finney, J.L.; Nicholas, J.D. y Quinn, J.E. (1979) *Nature*, **282**, 459.

Los campos de fuerza más utilizados en el estudio estructural de biomacromoléculas son el AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement)²¹⁶ y el CHARMM (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics).²¹³ Estos campos de fuerza no incluyen todos los grupos de átomos por lo que para el análisis de la estructura de complejos formados entre biopolímeros y moléculas pequeñas se hace necesario la implementación de los mismos, incluyendo aquellos tipos de átomos que no son comunes a las biomacromoléculas.

4.3. Minimización de energía.

Se trata de un problema de optimización no lineal de una función de energía potencial (V). El método consiste en encontrar los valores de las coordenadas que hacen mínima esa función.

El mecanismo seguido en la optimización de energía es el siguiente:

i) a partir de un conjunto de coordenadas, los algoritmos de minimización de energía se obtienen para cada átomo las coordenadas internas (distancia entre átomos en lazos, ángulos de enlace, etc.) y las comparan mediante la expresión del potencial con el valor en el equilibrio de la coordenada interna. A partir de aquí, calculan la energía potencial y su gradiente, el cual nos da la fuerza de cada átomo, para un conjunto determinado de posiciones atómicas.

$$F = - \nabla V \quad [18]$$

ii) a continuación, se aplica una pequeña perturbación y se calcula el valor de la función

²¹⁶ Weiner, P.K. y Kollman, P.A. (1981) *J. Comp. Chem.*, 2, 287.

²¹³ Brooks, B.R.; Bruccoleri, R.E.; Olafson, B.D.; States, D.J.; Swaminathan, S. y Karplus, M. (1983) *J. Comp. Chem.*, 4, 187.

para las nuevas coordenadas. Si el valor ha disminuido con respecto a la inicial, la perturbación continúa en ese sentido, en caso contrario se calcula la energía probando a perturbar el sistema en otra dirección. Se repite el proceso buscando la disminución de la energía potencial y obteniendo de ese modo una estructura molecular optimizada.

Normalmente, en modelización molecular se utilizan fundamentalmente algoritmos minimizadores de dos tipos: los métodos no convergentes y los métodos convergentes.

a) los métodos convergentes detienen el cálculo cuando se alcanza la configuración de mínima energía;

b) los métodos no convergentes no detienen nunca el cálculo, continúan “planeando” sobre la superficie de energía. Entre los primeros cabe destacar el *Steepest Descent*^{217,218} y entre los segundos el *Conjugate Gradient*.²¹⁹

a) *Steepest Descent* es el algoritmo minimizador más simple. En cada etapa se añade a las coordenadas una variación opuesta al gradiente de energía potencial. La variación se aumenta si la energía obtenida es menor y se disminuye si la energía es mayor. Aunque este método presenta una convergencia muy pobre, los desplazamientos de las posiciones son suaves y por tanto resulta útil para eliminar malos contactos.

b) *Conjugate Gradient*. Este algoritmo minimizador muestra una convergencia mejor.

Mientras que el *steepest descent* se basa en el gradiente de energía potencial de la etapa en la que se encuentra, el *conjugate gradient* utiliza la información del gradiente de la etapa en la que se encuentra junto con los gradientes de las etapas anteriores.

²¹⁷ Levitt, M. y Lifson, S. (1969) *J. Mol. Biol.*, **46**, 269.

²¹⁸ Gelin, B.R. (1976) *Tesis Doctoral*, Universidad de Harvard, Cambridge, MA.

²¹⁹ Fletcher, R. y Reeves, C.M. (1964) *Comput. J.*, **7**, 149.

4.4. Dinámica molecular.

La dinámica molecular es la ciencia de la simulación de los movimientos de las partículas de un sistema.²²⁰ Aplicada a muestras biológicas nos permite analizar las fluctuaciones de las posiciones relativas de los átomos de una proteína o un ADN como una función del tiempo.

Las macromoléculas biológicas son sistemas inherentemente dinámicos. Las simulaciones dinámicas no sólo incluyen los movimientos moleculares sino que permiten además el refinamiento de estructuras macromoleculares obtenidas a partir de datos de cristalografía de rayos X o RMN.

El elemento esencial de la simulación dinámica es el conocimiento del potencial de interacción de las partículas, a partir del cual es posible calcular las fuerzas y resolver las ecuaciones de movimiento de Newton que gobiernan la dinámica de las partículas. Será necesario integrar simultáneamente las ecuaciones:

$$F_i = -\nabla V_i \quad [19]$$

para todos los átomos del sistema, ya que el potencial sobre cada átomo es función de la posición del resto de los átomos.

Para poder comenzar una simulación dinámica es necesario tomar como punto de partida un conjunto inicial de coordenadas atómicas y de velocidades. Estas coordenadas iniciales pueden obtenerse a partir de los modelos de rayos X, RMN o de estructuras homólogas a las que se va a estudiar. Dado el conjunto de coordenadas, es necesario un cálculo preliminar para equilibrar el sistema. La estructura inicial es minimizada utilizando un algoritmo minimizador que elimine

²²⁰ Karplus, M. Petsko, G.A. (1990) *Nature*, 347, 631.

las posibles distorsiones (solapamiento de átomos, distorsiones en las longitudes de enlace, etc.). A continuación se asignan velocidades a los átomos siguiendo una distribución de Maxwell a baja temperatura y se realiza una simulación de pocos picosegundos. Esta simulación permite encontrar las aceleraciones “ag” de los distintos átomos y a partir de la ley de Newton:

$$F_i = m_i \cdot a_i \quad [20]$$

donde F_i es la fuerza que actúa sobre el átomo, obtenida a partir de la derivada del potencial con respecto a la posición; m_i es la masa del átomo i e a_i es la aceleración conferida a cada átomo. Estos valores se introducen en la ecuación [21].

$$r_i(t+\Delta t) = r_i(t) + V_i \Delta t + \frac{1}{2} (a_i(\Delta t)^2) + \dots \quad [21]$$

para el cálculo de la posición r_i en un tiempo $t+\Delta t$, dado un r_i a un tiempo t .^{221,222} Se repite para el proceso de forma iterativa hasta que se alcanza el valor de la temperatura elegida. La temperatura se mide a través de la energía cinética del sistema.

$$\sum m_i \langle V_i^2 \rangle = 3 N \cdot K_B \cdot T \quad [22]$$

donde N es el número de átomos del sistema, V_i^2 es la velocidad cuadrática media del átomo (i) y K_B es la constante de Boltzman.

Se considera que el sistema ha alcanzado el equilibrio cuando la temperatura permanece estable durante tiempos superiores a 10 picosegundos y las diferentes regiones de la macromolécula tienen la misma temperatura promedio.

La integración continuada de las ecuaciones de movimiento una vez alcanzado el equilibrio genera las coordenadas y velocidades de los átomos como una función del tiempo. El

²²¹ Beeman, D.J. (1976) *Comp. Phys.*, **20**, 103.

²²² Verlet, L. (1967) *Phys. Rev.*, **159**, 98.

intervalo Δt debe ser pequeño, de forma que el potencial no varíe mucho en cada etapa.

Una forma de comprobar si el cálculo es correcto sería aplicar el principio de conservación de energía²²³ ya que todas las fuerzas aplicadas en el cálculo son internas y por tanto se anulan entre ellas, pero en la práctica esto no ocurre así, la energía no se conserva debido a la serie de aproximaciones realizadas (en función del potencial, en la ecuación [21], etc.).

Este método de simulación presenta dos tipos de limitaciones: por una parte las aproximaciones realizadas en la función de energía potencial y por otra el tiempo necesario para realizar las simulaciones. En el primer caso se introducen en el cálculo los errores sistemáticos y en el segundo errores estadísticos. Resulta por tanto necesaria la búsqueda de funciones de potencial más refinadas que nos permiten obtener estructuras más exactas utilizando tiempos razonables.

²²³ Van Gunsteren, W.F. y Berendsen, H.J.C. (1990) *Biochem. Soc. Trans.*, **10**, 301.

II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

De todo lo dicho, cabe deducir que el control del grado de hidratación de la enzima es importante en su actividad catalítica. Dado que no se había realizado hasta la fecha un estudio sistemático sobre este punto en el caso de la lipasa de *Candida rugosa* liofilizada, actuando como catalizador suspendido en medios orgánicos, nos propusimos en esta Memoria a abordar los siguientes puntos:

1. Estudio comparativo de la actividad catalítica de la lipasa liofilizada de *Candida rugosa* de distinto origen o con distinto grado de pureza, actuando en medios orgánicos microacuosos.
2. Estudio del nivel de hidratación de estas muestras.
3. Modificación del grado de hidratación del microentorno añadiendo polioles, unidos covalentemente o no a la enzima.
4. Estudio comparativo de la actividad catalítica de estas enzimas modificadas y de las enzimas no modificadas.
5. Modelización de la interacción enzima-sustrato.

III. PARTE EXPERIMENTAL

1. MATERIALES.

1.1. Enzimas.

Lipasa de *Candida rugosa* (LCRC) tipo VII, número de lote 33HO115 fue proporcionada por la casa SIGMA Chemicals Co. (Missouri, EEUU). El lote contenía 860 U/mg de sólido, según el proveedor, siendo la unidad la cantidad de enzima que produce un microequivalente de ácido graso por hora en la hidrólisis de aceite de oliva a pH 7,2 a 37 °C, tras 30 minutos de incubación. La determinación por el método Biuret²²⁴ realizada por el proveedor reveló que la preparación contenía 2,425 unidades/mg de proteína.

La lipasa semipurificada de *Candida rugosa* (LCRS) se obtuvo a partir de LCRC por el procedimiento descrito por Sánchez-Montero y col.¹⁸⁹

Las lipasas crudas de *Candida rugosa* ATCC 14830 fueron obtenidas en la Universidad Autónoma de Barcelona por el equipo del Dr. Francisco Valero en diferentes condiciones de fermentación y denominadas en esta Memoria como *lipasas UAB*.

Las isoenzimas Lipasa A (LCRA) y Lipasa B (LCRB) se obtuvieron a partir de la LCRC por el procedimiento descrito por Rúa y col.¹⁷²

²²⁴ Robinson, H.W. y Hodgen, C.G. (1940) *J. Biol. Chem.*, **135**, 707.

¹⁸⁹ Sánchez-Montero, J.; Hammon, V.; Thomas, D. y Legoy, M. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1078**, 345.

¹⁷² Rúa, M.; Díaz-Mouriño, T.; Fernández, V.M.; Otero, C. y Ballesteros, A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1156**, 181-189.

1.2. Productos.

La casa FLUKA proporcionó el 9,10-dihidro-9-oxa-antraceno, el ácido (*R,S*) 2-fenil propiónico y los dextranos, denominados como “Dextran Standard” de *Leuconostoc mesenteroides*. Se trabajó con polímeros de diferente peso molecular: 6, 12, 25 y 50 KDa.

La casa ALDRICH CHEMICAL suministró el ácido perclórico al 60 % y las sales utilizadas para preparar patrones de a_w conocida: $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ($a_w = 0,32$), $MgNO_3 \cdot 6H_2O$ ($a_w = 0,52$), $NaCl \cdot H_2O$ ($a_w = 0,72$) y $LiCl \cdot H_2O$ ($a_w = 0,11$).

Las soluciones salinas utilizadas como patrón y con valores de humedad relativa conocida: 95 % a 25 °C (n° 74656) y 10 % a 25 °C (n° 74653) procedían de la casa ANAME.

La casa NOVASINA ha proporcionado las soluciones patrón de a_w conocida: sal-11 (humedad relativa = 11,3 % a 25 °C) y sal-98 (humedad relativa = 98 % a 25 °C).

Los terpenos utilizados procedieron de la casa SIGMA: mentol, isomentol, neomentol, nerol, geraniol y farnesol.

El ácido (*R,S*) 2(4-isobutilfenil) propanoico fue suministrado por BOOTS PHARMACEUTICALS.

El ácido (*R,S*) 2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico ha sido suministrado por SYNTEX RESEARCH.

El ácido (*R,S*) 2-(3'-benzoil)-fenilpropanoico ha sido suministrado por los Laboratorios MENARINI.

n-Propanol y los disolventes orgánicos empleados fueron adquiridos a MERCK. Todos los reactivos empleados fueron de pureza analítica.

2. MÉTODOS.

2.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS LIPASAS.

2.1.1. Lipasa de *Candida rugosa* comercial.

El preparado comercial poseía una actividad de 860 U/mg de sólido, como hemos indicado anteriormente, según el proveedor. A fin de cuantificar esta actividad en nuestras condiciones de trabajo, se procedió a la determinación del contenido en proteínas del sólido comercial como paso previo a la medida de la actividad hidrolítica.

A. Determinación de la cantidad de proteína.

Para la determinación del contenido en proteínas en muestras biológicas se pueden utilizar métodos colorimétricos, espectrofotométricos y fluorimétricos. La elección del método viene determinada fundamentalmente por la complejidad de la muestra, la precisión deseada y el número de muestras a analizar. En nuestro caso se ha empleado el método modificado de determinación de proteínas de Lowry y col.,²²⁵ propuesta por Hartree.²²⁶ Los métodos se basan en la formación de un producto coloreado como consecuencia de dos reacciones de la proteína con diversos reactivos: *i*) la reacción de la proteína en solución alcalina con tartrato cúprico y *ii*) la reacción de reducción de los iones fosfomolibdato y fosfowolframato, presentes en el reactivo de Folin-Ciocalteau, por los residuos Tirosina (Tyr) y Triptófano (Trp) de la proteína. El

²²⁵ Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randell, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 256-275.

²²⁶ Hartree, E.F. (1972) *Anal. Biochem.*, **48**, 422-427.

resultado es la formación de un complejo coloreado de intensidad proporcional al número de residuos.

El patrón de proteína empleado fue una solución de seroalbúmina bovina de 2 mg/ml en tampón Tris/HCl 0,1M a pH=7.

Los reactivos empleados fueron los siguientes:

Reactivo A. En 500 ml de NaOH 1N se añadieron 2 g de tartrato sódico-potásico y 100 g de Na₂CO₃ enrasando todo con agua bidestilada hasta 1l.

Reactivo B. En 90 ml de agua destilada se añadieron 2 g de tartrato sódico-potásico y 1 g de CuSO₄·5H₂O, enrasando finalmente hasta 100 ml con NaOH 1N.

Reactivo C. En 15 ml de agua se añadió 1 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu.

El procedimiento consistió en añadir en los tubos de ensayo perfectamente limpios y numerados, porciones de la solución patrón de proteína (2 mg/ml) igualando los volúmenes con agua destilada hasta 1 ml. A continuación se adicionaron 0,900 ml del reactivo A, se agitó rápidamente y se incubaron durante 10 min a una temperatura de 50 °C. Transcurrido este tiempo se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente y se añadió en cada uno de los tubos 0,100 ml del reactivo B. Después de agitar se dejaron reposar durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 3 ml del reactivo C, incubando de nuevo a 50 °C durante 10 min y dejando enfriar a temperatura ambiente. Al término de este tiempo el color fue estable durante un intervalo de tiempo comprendido entre 45 y 60 min, durante el cual se han de realizar las medidas de absorbancia.

Tabla III.1. Protocolo para la preparación de la recta de calibrado en la determinación de proteínas por el método Hartree.²²⁶

Disolución enzimática	Tubo	Proteína (µl/ml)	Reactivo A	Reactivo B	Reactivo C	Abs (λ=650nm)
Seroalbúmina bovina	1	-	0,9	0,1	3	0,043
	2	9,8	0,9	0,1	3	0,181
	3	14,7	0,9	0,1	3	0,291
	4	19,6	0,9	0,1	3	0,420
	5	24,5	0,9	0,1	3	0,438
	6	29,4	0,9	0,1	3	0,483
	7	34,3	0,9	0,1	3	0,566
	8	39,2	0,9	0,1	3	0,623
LCRC	9	-	0,9	0,1	3	0,068

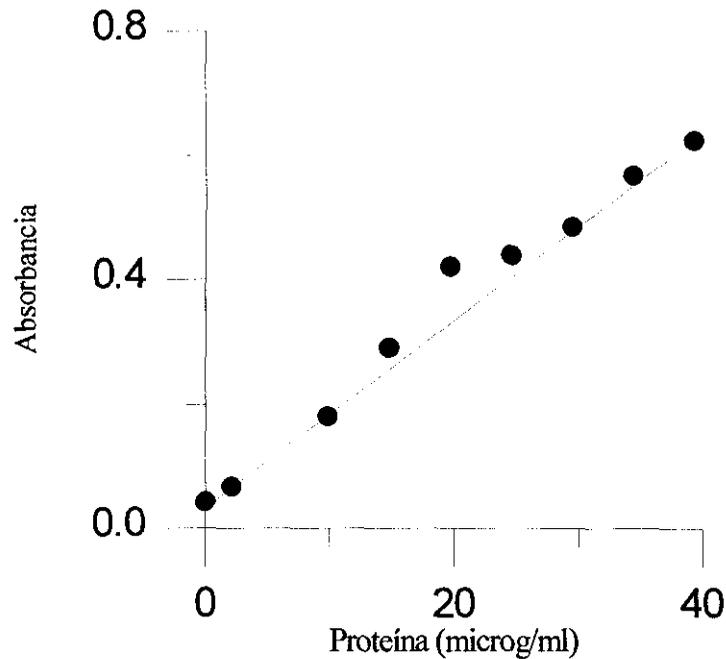
En la Tabla III.1 se indica el protocolo a seguir para realizar la curva de calibrado y la determinación del contenido de proteína de la preparación comercial. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu modelo 2100, a una $\lambda = 650$ nm y 25°C.

La solución problema de LCRC se preparó a partir de una disolución del polvo suministrado por la casa comercial en tampón Tris/HCl 0,1N, pH=7 en una concentración 2 mg sólido/ml, agitando uniformemente durante 2 h a una temperatura de 4 °C.

Para la determinación de la concentración de proteína se tomaron 30 µl del extracto enzimático de concentración 2 mg de sólido/ml, para posteriormente enrasar con agua destilada hasta 1 ml. Después se añadieron los reactivos correspondientes según el procedimiento descrito anteriormente. En la Figura III.1 se muestran los datos de absorbancia de las soluciones del patrón de concentración creciente. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

²²⁶ Hartree, E.F. (1972) *Anal. Biochem.*, **48**, 422-427.

Figura III.1. Recta de calibrado de la seroalbúmina bovina para realizar la determinación de proteínas por el Método Hartree.



$$A = 0,0158 [\text{Proteína } (\mu\text{g/ml})] + 0,035 \quad [23]$$

$$n = 9 \quad r = 0,976 \quad R^2 = 0,953$$

$$t_{\text{exp}} = 6,201 \quad F_{1,7 \text{ exp}} = 38,46 \quad F_{1,7 (\alpha=0,01)} = 12,2$$

Como $F_{1,7 \text{ exp}}$ es mayor que $F_{1,7 (\alpha=0,01)}$ podemos decir que el significado de la ecuación [23] es mucho mayor del 99 %.

B. Medida de la actividad hidrolítica.

Para la determinación de la actividad hidrolítica se emplearon glicéridos de ácidos grasos de diferente longitud de cadena. Anteriormente, miembros de nuestro grupo realizaron un estudio sobre las condiciones óptimas para esta caracterización, cuyos resultados mas relevantes fueron:

i) El intervalo de concentración de enzima comercial en el que la velocidad inicial de la actividad lipásica es proporcional a la concentración de la enzima es inferior a 0,8 mg de

preparado comercial/ml.¹⁸⁵ Por esta razón, al determinar la actividad hidrolítica, la disolución enzimática tuvo una concentración de 0,4 mg/ml.

ii) El pH óptimo de la reacción se fijó en 7,0; no obstante, en la bibliografía se pueden encontrar variedad de trabajos donde el pH óptimo de trabajo no coincide. Estas diferencias se pueden relacionar con la naturaleza del sustrato, es decir, con el pKa del ácido liberado en la interfase y con la presencia de diferentes medios orgánicos que conducen a aumentar el pH del microentorno del centro activo de la enzima al disminuir la constante dieléctrica del medio.

iii) La temperatura óptima de trabajo según lo descrito en la bibliografía para la hidrólisis de trioleína era de 37 °C.²²⁷ Sin embargo, al utilizar la tributirina, los ensayos cinéticos están descritos a 30 °C.^{189,228} Finalmente se optó por realizar los ensayos a una temperatura de 30 °C.

iv) Se estableció como medio óptimo de reacción el tampón Tris 0,1 M, pH = 7,0; confirmándose una mayor actividad con el empleo de tampones constituidos por moléculas orgánicas que con el tampón fosfato,¹⁷⁹ tradicionalmente utilizado en la bibliografía.

Las disoluciones se prepararon pesando una cantidad determinada de la preparación comercial que se disolvió en un matraz aforado en tampón Tris/HCl 0,1M, pH=7, se mantuvo agitando durante 2 h, a una temperatura de 4 °C. Si la solución enzimática no se empleaba inmediatamente, se almacenaba a -20 °C en viales.

En todos los casos la actividad ha sido medida mediante un sistema potenciométrico de

¹⁸⁵ Hernáiz, M.J. (1996) *Tesis Doctoral*. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

²²⁷ Tsai, S.W.; Wu, G.M. y Chiang, C.L. (1991) *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 761.

¹⁸⁹ Sánchez-Montero, J.; Hammon, V.; Thomas, D. y Legoy, M. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1078**, 345.

²²⁸ Goldberg, M. (1989) *Tesis Doctoral*. Universidad de Compiegne. Francia.

¹⁷⁹ Moreno, J.M. (1994) *Tesis Doctoral*. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

valoración automática a pH constante (pH-stato) de la casa METROHM formado por un procesador incorporado a 40 Mhz; una unidad de valoración Metrohm 665; una unidad de agitación Metrohm 649; un electrodo de pH, pH-metro, Metrohm 691; un módulo registrador, Metrohm 614 Impulsomat; un dosificador, Dosimat 605; una impresora Epson LX-800 y un reactor termostatzado por recirculación de agua.

Como sustratos se emplearon triglicéridos de ácidos grasos de diferente longitud de cadena, como son la trioleína y la tributirina.

Para ver la actividad frente a trioleína se ha empleado el sustrato proporcionado por SIGMA DIAGNOSTIC, que consiste en una emulsión de aceite de oliva al 50 % (v/v) que contiene un 0,1 % de azida sódica como conservante. El aceite de oliva contiene un 83,5 % de glicéridos del ácido oleico, de los cuales el constituyente más abundante es la trioleína (trioleato de glicerilo).

La reacción de hidrólisis se ha llevado a cabo añadiendo al reactor 9 ml de tampón y 1 ml de una disolución enzimática de concentración 4 mg/ml. La mezcla se mantuvo con agitación constante durante 10 min a una temperatura de 30 °C. Transcurrido este tiempo en el que la enzima se ha acondicionado a la temperatura y al medio tamponado que constituían las condiciones de reacción se han añadido 50 µl del sustrato. Las velocidades iniciales se han medido utilizando el método de valoración a pH-fijo anteriormente descrito, valorando el ácido producido con NaOH previamente normalizada utilizando como patrón ftalato ácido de potasio. La concentración de la NaOH utilizada ha sido 0,0025 N ($f = 0,995$) proporcional a la actividad enzimática observada en los diferentes ensayos realizados.

El otro sustrato empleado para la caracterización lipásica de LCRC ha sido la tributirina, (tributirato de glicerilo) proporcionada por ALDRICH.

Para medir la actividad frente a tributirina ha sido necesario preparar una solución emulsificante para la preparación del sustrato objetivo de la reacción. Esta solución emulsificante estaba formada por:

- NaCl (ALDRICH) 1,79 g
- KH₂PO₄ (PANREAC) 0,041g
- glicerol (ALDRICH) 54 ml
- goma arábica (SIGMA) 1 g
- agua bidestilada, c.s.p. 100 ml.

La preparación de esta solución emulsificante consistió en poner en un matraz aforado de 100 ml el NaCl, KH₂PO₄ y la goma arábica, añadiéndose a continuación el glicerol y un poco de agua bidestilada. La mezcla se agitó cuidadosamente y cuando estuvo disuelta la goma arábica se enrasó con agua bidestilada hasta 100 ml.

Para la preparación de la emulsión se ha previsto un volumen suficiente para los ensayos correspondientes para cada día. Para un volumen de 100 ml la emulsión contenía:

- tributirina 0,15 M: 4,39 ml
- solución emulsificante: 2 x 4,3949 ml: 8,78 ml
- tampón Tris/HCl 0,1 M (pH = 7) (c.s.p. 100 ml): 86,81 ml

Todos los componentes se mezclaban bien por agitación y se emulsificaba la muestra en un baño de ultrasonidos durante 15 min para formar una microemulsión homogénea.

La reacción se ha llevado a cabo en un reactor a 30 °C, con agitación constante, en el que se han puesto 5 ml de tampón Tris/HCl 0,1 M (pH = 7), a continuación se ha añadido 1 ml de la solución enzimática y después de 10 min de acondicionamiento de la enzima a la temperatura y medio tamponado de trabajo, se han añadido 4 ml de la emulsión.

Las velocidades iniciales se han medido utilizando un método de valoración a pH-fijo bajo agitación constante, valorando el ácido producido con NaOH previamente estandarizada utilizando como patrón ftalato ácido de potasio. La concentración de la NaOH empleada ha sido 0,0025 N ($f = 0,995$) proporcional a la actividad enzimática observada en los diferentes ensayos realizados.

En todos los casos las experiencias se han realizado por triplicado, expresándose los resultados a partir de la media obtenida en los ensayos, con un error máximo de un 5 %. Una unidad de actividad (U) se define, en nuestras condiciones de ensayo, como la cantidad de enzima que libera un μmol de ácido graso por minuto de reacción.

C. Medida de la actividad ester sintetasa. Síntesis del oleato de heptilo.

Dado que la actividad hidrolítica de un preparado enzimático no se corresponde con la actividad sintetasa en medios orgánicos, se ha definido en el grupo de trabajo la síntesis del oleato de heptilo como reacción test para determinar esta actividad.

La reacción se ha llevado a cabo en un reactor en el que se ponían el ácido oleico (66 mM) y el heptanol (66 mM) en un volumen final de 10 ml de isooctano y una concentración de preparado enzimático sólido (10 mg/ml de disolvente), a 30 °C y con agitación constante. Se han ido extrayendo del medio de reacción alícuotas de 100 μl que posteriormente eran diluidas hasta 1,5 ml de isooctano que contenía una concentración conocida de patrón interno para su posterior análisis por cromatografía de gases. El aparato utilizado ha sido un cromatógrafo de gases modelo Shimadzu GC-14A equipado con detector de ionización de llama (FID), un inyector con split (1:2), una columna SPB-1 (15 m x 0,32 mm) (Supelco Inc. Bellafonte; PA, EE.UU). La temperatura inicial de la columna ha sido de 120 °C durante 5 min, posteriormente se ha ido

aumentando a 13 °C por min hasta llegar a una temperatura final de 250 °C la cual se ha mantenido durante 10 min. La temperatura del inyector fue de 250 °C y la temperatura del detector fue de 250 °C. La fase móvil empleada ha sido una corriente de nitrógeno con un flujo de 60 ml/min.

La cuantificación de los productos de reacción se ha realizado mediante el método del patrón interno, que permite deducir el mínimo de errores debidos a la variabilidad en la preparación y extracción de la muestra, en la respuesta del instrumento y en la técnica analítica. En la práctica se añade a la muestra una concentración conocida de patrón interno, que en nuestro caso ha sido el 1-octanol. Las variaciones aleatorias en el volumen de inyección de la muestra se compensan automáticamente pues el patrón interno forma parte de la muestra. El factor de respuesta se calcula mezclando una concentración conocida del patrón interno puro (1-octanol) con varias concentraciones conocidas de los componentes puros (heptanol). El protocolo seguido para la determinación del factor de respuesta (R_f) ha consistido en una disolución formada por 1-heptanol: 4 mM y, 1-octanol: 8mM en isooctano. Esta disolución fue analizada por cromatografía de gases en las condiciones anteriormente citadas, siendo los tiempos de retención de 3 y 5 min para el heptanol y octanol respectivamente. El cálculo de (R_f) se realizó a través de la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{C_H}{C_O} \cdot \frac{S_O}{S_H} \quad [24]$$

donde C_H y C_O son las concentraciones de heptanol y octanol respectivamente y S_O y S_H son las áreas de octanol y heptanol obtenidas en cada cromatograma. En los análisis de las muestras la concentración de heptanol (C_H) que no se esterifica con el ácido oleico se calcula a partir de la

fórmula del R_f , y por diferencia se calcula el oleato de heptilo formado. Esto es:

$$C_H = C_O \cdot R_f \cdot \frac{S_H}{S_O} \quad [25]$$

Así mismo, para determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima en medio orgánico se tomó esta misma reacción como referencia. El procedimiento experimental fue el indicado anteriormente, con las condiciones y la metodología antes reseñada. El estudio se llevó a cabo a una temperatura de trabajo de 50 °C y el seguimiento de la reacción se llevó a cabo durante 150 h.

D. Desactivación por disolvente orgánico.

Para estudiar el efecto del disolvente orgánico se llevó a cabo un experimento que consistió en mantener una determinada cantidad de preparado enzimático en el seno de un disolvente orgánico y observar el efecto provocado por éste sobre su actividad después de largos periodos de contacto y en condiciones estándar de reacción, esto es, 30 °C y 500 rpm de agitación, ya que fueron éstas las condiciones empleadas en las reacciones de síntesis llevadas a cabo a lo largo de esta Memoria.

Para ello se preparó una batería de reactores que contenían 200 mg de LCRC y 10 ml de disolvente orgánico. Se mantuvo a 30 °C y con una agitación de 500 rpm. Cada reactor se fue retirando periódicamente y se añadía sobre la preparación enzimática embebida en el disolvente orgánico los sustratos correspondientes a una reacción test, que fueron: (R,S) 2-(4-isobutil)fenil propanoico (66mM) y n-propanol (66mM). Todo ello se mantenía a 30 °C y 500 rpm de agitación durante 168 h. Posteriormente la conversión en ester a las 168 h de iniciarse la reacción se

analizó por cromatografía de gases. Para ello, se empleó un cromatógrafo de gases modelo Shimadzu GC-14A equipado con detector FID, un inyector con split (1:2), una columna SPB-1 (15 m x 0,32 mm). La temperatura del inyector fue de 300 °C y la del detector fue de 350 °C. La fase móvil fue nitrógeno con un flujo de 12 ml/min y una temperatura de columna de 180 °C. Los tiempos de retención para el ácido y el ester fueron de 4 y 5 min respectivamente.

E. Desactivación térmica en medio orgánico.

Para determinar la termoestabilidad del preparado cuando se trabajaba en medio anhidro se procedió a la incubación de la preparación enzimática en isooctano a 50 °C, manteniéndose en estas condiciones a lo largo de diferentes tiempos (0, 8, 15, 40, 60, 80, 90 h). Para determinar el efecto de la temperatura en el medio orgánico, se tomó como reacción test la síntesis de oleato de heptilo. Las condiciones experimentales y la metodología llevada a cabo fueron las descritas anteriormente.

Los valores de actividad en función del tiempo, se ajustaron a una ecuación de decrecimiento exponencial simple [9], o a una ecuación de decrecimiento exponencial doble [10], según el caso:

$$A = A_0 \cdot e^{-kt} + A_1 \quad [26]$$

$$A = A_1 \times e^{-kt_1} + A_2 \times e^{-kt_2} + A_3 \quad [27]$$

Para explicar los resultados se acudió al modelo de desactivación de Henley y Sadana:²²⁹



²²⁹ Henley, J.P. y Sadana, A. (1985) *Enzyme Microbiol. Technol.*, 7, 50-60.

donde k_1 y k_2 son las constantes de desactivación; E, E_1 y E_2 son la enzima y los intermedios que aparecen durante la desactivación, y α_1 y α_2 son las relaciones entre las actividades específicas E_1/E_2 y E_2/E , respectivamente. Estos autores asumen que la actividad enzimática, A, a un tiempo t es el promedio de las actividades específicas de cada estado, siendo E_0 la actividad inicial a tiempo $t=0$.

$$A = \frac{E + \alpha_1 \cdot E_1 + \alpha_2 \cdot E_2}{E_0} \quad [29]$$

Esta actividad puede escribirse, en función de los parámetros iniciales como ecuación en la que se asumen decrecimientos exponenciales simples para describir la desactivación, y donde α_1 y α_2 se expresan en tanto por ciento.

$$A = \alpha_2 + \left[100 + \frac{\alpha_1 \cdot k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 \cdot k_2}{k_2 - k_1} \right] \cdot e^{-k_1 t} + \left[\frac{\alpha_1 \cdot k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 \cdot k_2}{k_2 - k_1} \right] \cdot e^{-k_2 t} \quad [30]$$

Las curvas de desactivación obtenidas con los datos experimentales, se ajustaron mediante la utilización del programa SIMFIT.²³⁰ A partir de estas ecuaciones ajustadas, se calcularon las constantes de desactivación k_1 y k_2 , las relaciones α_1 y α_2 , la vida media ($t_{1/2}$) y el factor de estabilización (F). Este factor se define como la relación entre la vida media del derivado modificado y la vida media de la enzima nativa en las mismas condiciones de almacenamiento y con la misma cantidad de proteína.

²³⁰ Bardsley, W.G. (1995) Programa SIMFIT (versión 3.8) School of Biological Science. University of Manchester, UK.

2.1.2 Lipasa de *Candida rugosa* semipurificada (LCRS).

Dado el elevado número de impurezas de la muestra comercial, se ha semipurificado la misma, a fin de poder hacer trabajos de modificación química donde el biocatalizador fuera más reproducible que el polvo comercial. El objetivo consiste en eliminar el contenido no proteico existente en el polvo comercial, sin pretender una total purificación con respecto a otras proteínas o glicopéptidos que pudieran estar presentes en los extractos.

La metodología seguida se basa en la descrita por Sánchez-Montero y col.¹⁸⁹ Este procedimiento se basa en eliminar por diálisis la lactosa y pequeñas moléculas de $P_m < 20$ KDa contenidas en el preparado comercial lo cual permite estudiar su influencia en el estado de hidratación del microentorno de la preparación comercial y su repercusión en la actividad catalítica de la misma.

Una cantidad pesada de esta enzima (1 gramo) se suspendió en 20 ml de agua bidestilada, se agitó a 4 °C durante 1 hora (700-800 rpm). Pasado este tiempo, para eliminar las impurezas insolubles en agua, el sobrenadante se introdujo en una membrana de diálisis que excluye moléculas con un peso molecular inferior a 20 KDa. Posteriormente, la membrana de diálisis se sumergió en un vaso de precipitados que contenía 2 l de agua bidestilada (pH = 5,5). Se mantuvo durante un tiempo de 24 h en el mismo a 4 °C, con agitación constante de 700-800 rpm. El agua de diálisis se cambió periódicamente cada 2 h, durante las primeras 6 h, y posteriormente, 1 h antes de acabar el proceso. Finalmente, la muestra se congeló en acetona/nieve carbónica y se liofilizó durante 24 h. El material obtenido se pesó y se observó que el rendimiento final del proceso vino a ser en todos los casos de un 25 %. Esta muestra final resultante se conservó a -20

¹⁸⁹ Sánchez-Montero, J.M.; Hammon, V.M.; Thomas, D. y Legoy, M.D. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1078**, 345.

°C para su posterior manipulación.

A. Determinación de la cantidad de proteína.

La metodología y las condiciones experimentales fueron las empleadas según lo descrito por el método Hartree,²²⁶ la curva de calibrado empleada para deducir el porcentaje de proteínas a partir del valor de la absorbancia se muestra en la Figura III.1.

B. Medida de la actividad hidrolítica.

Las condiciones experimentales y la metodología para este ensayo con trioleína y tributirina ya fueron descritas anteriormente.

C. Medida de la actividad ester sintetasa. Síntesis del oleato de heptilo.

La metodología y las condiciones experimentales para llevar a cabo la determinación de esta actividad se comentaron anteriormente.

D. Desactivación térmica en medio orgánico.

El experimento se realizó en las mismas condiciones que fueron definidas para la LCRC. De esta manera se podía observar el efecto que tenía el proceso de semipurificación sobre la termoestabilidad del preparado.

²²⁶ Hartree, E.F. (1972) *Anal. Biochem.*, **48**, 422-427.

2.1.3 Lipasa A (LCRA) y Lipasa B (LCRB) puras de la lipasa de *Candida rugosa* comercial.

En la introducción teórica (Sección I.2.3.) se ha indicado que la lipasa cruda secretada por la *Candida rugosa* es una mezcla de isoformas, cuya proporción y naturaleza depende de la naturaleza del inductor y de las condiciones de fermentación (velocidad de agitación, aire, etc.). Es por ello por lo que se procedió a aislar las isoformas LA y LB del preparado comercial de SIGMA y caracterizarlas en las mismas condiciones que se hizo para las LCRC y LCRS.

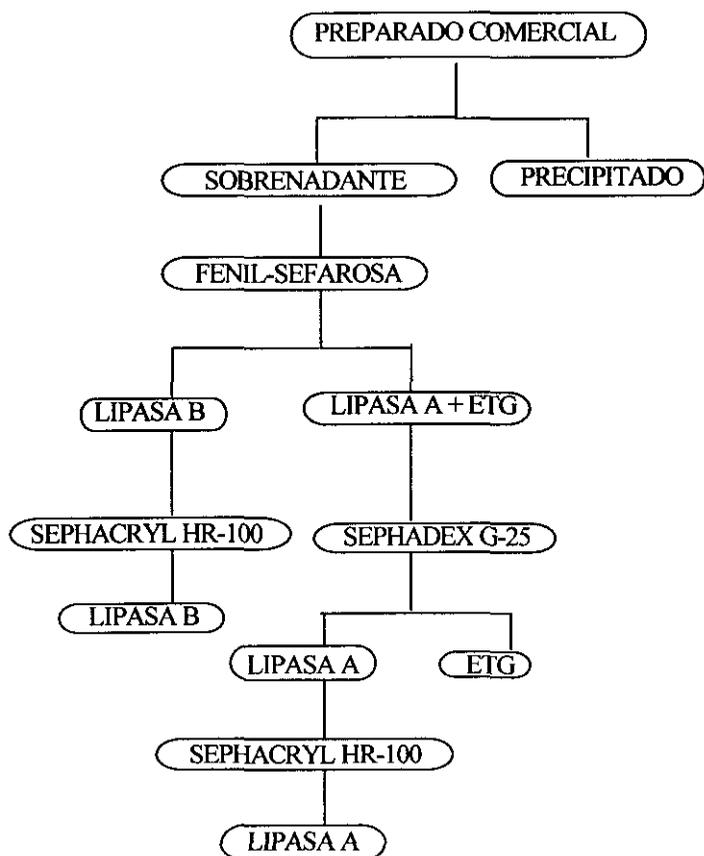
La metodología seguida en el aislamiento de las isoformas LCRA y LCRB de *Candida rugosa* mediante técnicas cromatográficas aparece resumido en el Esquema y consta de las siguientes etapas.¹⁷²

a) Solubilización y centrifugación.

Se pesaron unos 25 g de LCRC que se resuspendieron en 250 ml de tampón $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,25 M (pH = 7,0), la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y se centrifugó durante 30 min a 12.000 rpm en una centrífuga KONTRN Instruments Centrikon T-124.

¹⁷² Rúa, M.; Díaz-Mouriño, T.; Fernández, V.M.; Otero, C. y Ballesteros, A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1156**, 181-189.

Esquema III.1. Método de purificación de la LCRC descrito por Rúa y col.¹⁷²



b) Cromatografía hidrofóbica en columna de Fenil-sefarosa CL-4.

Primeramente se equilibró la columna de Fenil-sefarosa CL-4 (5 x 60 cm) con tampón $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,25 M (pH = 7,0) a un flujo de 300 ml/h y a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido en la centrifugación anterior se introdujo en dicha columna a un flujo de 240 ml/h. Posteriormente, la columna se lavó tres veces con el tampón de equilibrio hasta conseguir que las fracciones no tuvieran coloración ni dieran absorbancias significativas. Para ello se recogieron fracciones de 7,5 ml cada una y se midió la absorbancia a $\lambda = 280$ nm. Las dos

¹⁷² Rúa, M.; Díaz-Mouriño, T.; Fernández, V.M.; Otero, C. y Ballesteros, A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1156**, 181-189.

isoformas de la lipasa de *Candida rugosa*, Lipasa A (LCRA) y Lipasa B (LCRB), quedaron absorbidas en la columna debido a su hidrofobicidad.

Para eluir la LCRB (lipasa menos hidrofóbica), se disminuyó la fuerza iónica, con un tampón $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 1 mM (pH = 7,0). Se recogieron fracciones de 7,5 ml con un flujo de 240 ml/h y se midieron las absorbancias de éstas a 280 nm. Se representaron los valores de absorbancia en función del número de fracciones obtenidas y se seleccionaron las fracciones que serían introducidas en la siguiente columna, concentrándolas previamente por ultrafiltración con una membrana AMICON PM-30, que permite pasar aquellas moléculas que cuentan con un peso molecular menor a 30 KDa.

Para eluir la LCRA (lipasa más hidrofóbica), se utilizó tampón $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,25 M (pH = 7,0) a 1 mM, con 50 % de etilenglicol. Se recogieron fracciones de 7,5 ml a un flujo de 240 ml/h y se midieron las absorbancias a 280 nm. Una vez representadas las absorbancias en función del número de fracciones recogidas se seleccionaron las que se cargarían en la siguiente columna, concentrándolas previamente por ultrafiltración con una membrana AMICON PM-30.

c) Cromatografía de exclusión molecular en columna de *Sephadex G-25*.

La separación de la LCRA del etilenglicol se llevó a cabo mediante una cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephadex G-25 (2,5 x 37 cm) equilibrada con tampón $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,1 M (pH = 7,0) conteniendo NaCl 0,1 M a un flujo de 70 ml/h y a 4 °C. Se eluyó la muestra con el mismo tampón de equilibrio a un flujo de 38 ml/h y las fracciones recogidas fueron de 3,7 ml. En todas ellas se midió la absorbancia a 280 nm. De la representación de los valores de absorbancia en función del número de fracciones recogidas se seleccionaron las que se emplearían con la siguiente columna, concentrándolas previamente por ultrafiltración con

membrana AMICON PM-30.

d) Cromatografía de exclusión molecular en columna *Sephacryl HR-100*.

Las dos isoformas, LCRA y LCRB, separadas y concentradas anteriormente, se cargaron por separado en una columna de Sephacryl HR-100 (2,6 cm x 1 m). Esta columna se equilibró en tampón $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,1 M (pH = 7,0) conteniendo NaCl 0,1 M a un flujo de 50 ml/h y a 4 °C. Al pasar la muestra, se trabajó en el mismo tampón de equilibrio a un flujo de 20 ml/h. Se recogieron fracciones de 5 ml y se midió la absorbancia a $\lambda = 280$ nm. Después de representar los valores de absorbancia en función del número de fracciones recogidas, se seleccionaron las que iban a ser concentradas por ultrafiltración con membrana AMICON PM-30. Cuando fue necesario las fracciones enriquecidas en cada una de las lipasas se juntaron, se concentraron y se recromatografiaron en las mismas condiciones.

Tras la separación y purificación de ambas isoenzimas, se dializaron con una membrana de diálisis que excluía moléculas con un peso molecular menor a 14 KDa, con la finalidad de eliminar iones de la muestra debidos fundamentalmente al tampón y en parte al NaCl. La membrana de diálisis se sumergió en un vaso de precipitados que contenía 2 l de agua bidestilada a 4 °C, con una agitación constante de 700-800 rpm durante 24 h. El agua se cambió periódicamente cada dos horas durante las primeras 6 h y una hora antes de acabar el proceso. Posteriormente congelamos en acetona/nieve carbónica y liofilizamos las muestras durante 48 h. El material obtenido se pesó y se conservó a -20 °C para su posterior utilización.

La caracterización de estas isoformas ya había sido realizada por miembros de nuestro

grupo,¹⁸⁵ de esta manera sabemos que ambas isoformas presentan una serie de características que hay que tener en cuenta:¹⁷²

- los pesos moleculares son similares: 64 KDa para LCRA y 62 KDa para LCRB,
- el punto isoeléctrico es diferente: 5,5 para LCRA y 4,8-5,0 para LCRB,
- tienen diferente porcentaje de hidratos de carbono neutros: 8 % en LCRA y 3,6 % en LCRB,
- presentan una disposición diferente de los triptófanos en la cadena. Estos residuos están más expuestos al medio en el caso de la LCRB que en el de la LCRA,¹⁸⁵
- ambas isoformas presentan distinta actividad lipásica frente a trioleína y esterásica frente a butirato de p-nitro-fenilo,¹⁴⁸ donde también se compara la actividad sintética en la preparación del oleato de heptilo,
- de la misma manera la desactivación térmica frente al medio orgánico es diferente para cada una de las isoformas.

¹⁸⁵ Hernáiz, M.J., *Tesis Doctoral*, (1996) Universidad Complutense de Madrid.

¹⁷² Rúa, M.; Díaz-Mouriño, T.; Fernández, V.M.; Otero, C. y Ballesteros, A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1156**, 181-189.

¹⁴⁸ Hernáiz, M.J.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1996) *Biotechnol. Tech.*, **10**, 917-922.

2.1.4. Lipasas obtenidas en condiciones de fermentación controladas. *Lipasas UAB.*

Dado que la producción de la lipasa puede modularse por la naturaleza del inductor²³¹ o por las condiciones del fermentador,^{232,233} el equipo de investigación del Dr. Francisco Valero de la Universidad Autónoma de Barcelona nos proporcionó una serie de lipasas procedentes de la levadura de *Candida rugosa* obtenidas en diferentes condiciones de fermentación. El sistema desarrollado por el grupo del Dr. Valero permite monitorizar y controlar el proceso de fermentación para obtener una lipasa reproducible²³⁴. El protocolo del diseño consistió en utilizar el ácido oleico como única fuente de carbono obteniendo con ello un biocatalizador con unas características diferentes a las de la preparación comercial.

El cultivo de la levadura *Candida rugosa* (ATCC 14830) se llevó a cabo en reactores *feed-batch* en los que se fueron suministrando emulsiones de ácido oléico como única fuente de carbono y en diferentes condiciones de fermentación tal y como se muestran en la Tabla III.2; a continuación, las enzimas obtenidas se caracterizaron de manera análoga a la indicada para las lipasas anteriores.

²³¹ Del Río, J.L.; Serra, T.; Valero, F.; Puch, M. y Solá, C. (1993) *Biotechnol. Lett.*, **12**, 835-838.

²³² Montesinos, J.L.; Lafuente, J.; Gordillo, M.; Valero, F.; Solá, C.; Charbommier, S. y Cheury, A. (1995) *Biotechnol. Bioeng.*, **48**, 573-584.

²³³ López, S.; Valero, F. y Solá, C. (1996) *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **59**, 15-24.

²³⁴ Montesinos, J.L.; Compmajó, C.; Iza, J; Lafuente, J. y Solá, C. (1994) *Process Control Quality*, **5**, 237-244.

Tabla III.2. Condiciones de fermentación y cultivo y valores de la actividad lipolítica extracelular y rendimiento al final de la operación.

Parámetros	UAB	UAB-300	UAB-1000
Fermentador	Braun Biostat-E	Braun Biostat-UD	Braun Biostat-UD
Volumen del cultivo (l)	5	50	50
^a C.A.	0,2	0,4	0,4
Agitación (rpm)	500	700	500
Flujo del aire (vvm)	0.1-1	0.1-1	0.1-1
^b Tratamiento	Liofilización + lactosa	Precipitación en etanol	Precipitación en etanol
^c A.L.	40	6,6	8,8
^d Rendimiento	4,7	0,8	0,9

^a C.A.: Caudal de adición (g/h l bioreactor).

^b Tratamiento posterior a la operación.

^c A.L.: Actividad lipolítica (U/ml), al final de la operación.

^d Rendimiento: (U/ml g biomasa), al final de la operación.

A. Determinación de la cantidad de proteína.

Como en los casos anteriores se siguió para ello la técnica descrita por Hartree,²²⁶ empleando la curva de calibrado que se muestra en la Figura III.1.

B. Medida de la actividad hidrolítica.

La determinación de esta actividad se realizó a través de la hidrólisis de trioleína y tributirina según la metodología y condiciones experimentales ya descritas.

C. Medida de la actividad ester sintetasa. Síntesis del oleato de heptilo.

La caracterización de la actividad sintetasa de las lipasas suministradas por el grupo del Dr. Valero se llevó a cabo con la reacción de esterificación del oleato de heptilo, cuya

²²⁶ Hartree, E.F. (1972) *Anal. Biochem.*, **48**, 422-427.

metodología y condiciones experimentales ya han sido descritas anteriormente. Así mismo, se realizó el mismo ensayo a 50 °C para poder determinar el efecto de la temperatura en la actividad sintetasa.

D. Desactivación por disolvente orgánico de UAB.

La metodología para este ensayo así como las condiciones experimentales coinciden con lo expuesto para la preparación comercial (LCRC). Este hecho se puso de manifiesto al tratar cada una de las preparaciones, mantenidas durante un determinado período de tiempo en presencia de isooctano a 30 °C y 500 rpm, como catalizadores de una reacción formada por ácido (*R,S*) 2(4-isobutilfenil) propanoico 66mM, n-propanol 66mM, 30 °C de temperatura y una agitación de 500 rpm. Se midió la conversión alcanzada a las 168 h de iniciada la reacción.

E. Desactivación térmica en medio orgánico.

Con el fin de hacer un balance comparativo con respecto a la preparación comercial, se realizó un ensayo de termoestabilidad en medio orgánico en las mismas condiciones y metodología descritas.

2.2. MODIFICACIÓN DE LAS LIPASAS DE PARTIDA CON DEXTRANOS.

Como se comentó en la Introducción de esta memoria una de las metodologías que se utilizan para la modificación de glicoproteínas es la unión a polisacáridos de distinta naturaleza y peso molecular. En esta memoria el trabajo realizado se puede dividir en los siguientes apartados.

- i) Formación de complejos no covalentes lipasa-dextrano.
- ii) Formación de complejos covalentes lipasa-dextrano.

En todos los casos se ha empleado como enzima de referencia la LCRS, ya que el preparado comercial (LCRC) tiene tantas impurezas que no puede conducir a resultados fiables e interpretables.

Una vez optimizadas las condiciones de formación de los complejos de enzimas modificadas, se realizaron los ensayos con las lipasas UAB.

2.2.1. Complejo enzima-dextrano no covalente (LCRm).

Este tipo de complejos se prepararon teniendo presente el efecto activador-estabilizador de la lactosa monohidratada sobre la LCRC demostrada por Sánchez-Montero y col.¹⁸⁹ y Adlercreutz.²³⁵

Se prepararon una serie de complejos no covalentes enzima-dextrano con diferente proporción de enzima y de dextrano y a su vez se emplearon dextranos de diferente peso

¹⁸⁹ Sánchez-Montero, J.M.; Hammon, V.M.; Thomas, D. y Legoy, M.D. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1078**, 345.

²³⁵ Adlercreutz, P. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1163**, 144-148.

molecular para así poder estudiar el efecto de la presencia del dextrano y la importancia del tamaño molecular del polímero en la estabilidad y en la actividad catalítica del nuevo biocatalizador. De esta manera los preparados tuvieron una determinada proporción enzima/dextrano para cada tipo de polímero, que fue la siguiente:

- con dextranos de peso molecular de 6.000 Da, los preparados utilizados tuvieron las proporciones enzima/dextrano de: 40/10, 40/20, 40/30 (p/p).
- con dextranos de peso molecular de 12.000 Da, los complejos tuvieron las siguientes proporciones: 40/10, 40/20 y 40/30 (p/p).
- con dextranos de peso molecular de 25.000 Da, las proporciones enzima/dextrano empleadas fueron: 40/5, 40/10 y 40/20 (p/p).
- con dextranos de peso molecular de 50.000 Da los complejos utilizados contaron con las siguientes proporciones de enzima/dextrano: 40/5, 40/10 y 40/15 (p/p).

Como puede apreciarse, al aumentar el peso molecular del dextrano, su proporción relativa en peso dentro del derivado se fue disminuyendo, pues los dextranos de peso molecular elevado podían eliminar el agua del microentorno de la enzima y provocar una desactivación de la misma.¹³²

El método experimental consistió en pesar 40 mg de LCRS, que a continuación se mezclaron con una cantidad diferente de dextrano, de un determinado peso molecular, de acuerdo con la relación enzima/dextrano deseada. La mezcla se diluyó en 10 ml de agua bidestilada y se mantuvo durante 30 min a 4 °C con agitación constante (500 rpm). Posteriormente, la mezcla se

¹³² De Diego, T.; Lozano, P.; Níguez, M.J. e Iborra, J.L. (1998) en *Stability & Stabilization of Biocatalysts*, pág. 411-416. Eds: Ballesteros, A.; Plou, F.J.; Iborra, J.L. y Halling, P.J. Elsevier Sc. Publ.

congeló en acetona/nieve carbónica y se liofilizó durante 24 h. Después de este tiempo, la muestra fue recogida y almacenada a -20 °C para su posterior utilización.

A. Determinación de la cantidad de proteína.

Para comprobar si el proceso de unión al azúcar provocaba algún efecto distorsionante sobre la determinación de proteínas del derivado se analizó con el método Hartree²²⁶ el porcentaje de proteínas de los derivados, que contenían diferentes proporciones de dextrano de diferente peso molecular.

B. Determinación del grado de modificación.

Para determinar el grado de modificación del preparado enzimático se siguió el método de la antrona de Clegg,²³⁶ basado en que la muestra es digerida con ácido perclórico, de manera que los polisacáridos son hidrolizados a monosacáridos. Su concentración se determina colorimétricamente por el método de la antrona y se expresa el contenido de hidratos de carbono en gramos de glucosa. Como nosotros partimos de una preparación formada por enzima semipurificada en la que se había eliminado previamente la lactosa y otros contaminantes por diálisis podemos afirmar que la cantidad de azúcares determinados por este método procede fundamentalmente del polímero modificador. Esto nos permite determinar la relación real en peso enzima/dextrano existente en el complejo no covalente.

²²⁶ Hartree, E.F. (1972) *Anal. Biochem.*, **48**, 422-427.

²³⁶ Clegg, K.M. (1956) *J. Sci. Food Agric.*, **7**, 40.

El reactivo de antrona se prepara a partir de una disolución al 0,1 % de antrona en ácido sulfúrico al 70 %, que previamente ha sido preparado y enfriado antes de usar. Es necesario preparar este reactivo fresco cada día.

La metodología consistió en pesar 50 mg del complejo enzima/dextrano que se llevaron a un matraz aforado de 100 ml con 15 ml de ácido perclórico al 60 % manteniéndose la mezcla en agitación constante (500 rpm) durante 24 h. Durante este tiempo se rompen los enlaces glicosídicos y la disolución va tomando una coloración parda a medida que aumenta la concentración de glucosa en el medio. Finalizada la reacción se enrasa el matraz hasta 100 ml con agua bidestilada. Para confirmar que ha habido una hidrólisis total de polisacárido se toma una pequeña muestra y se la hace reaccionar con yodo. La ausencia de coloración azul indica que no hay polisacáridos en la mezcla después de la hidrólisis realizada. A continuación se hace una dilución de la muestra al 10 % para proceder a su valoración cuantitativa.

Paralelamente se preparó una solución patrón de glucosa diluída, a partir de 1 mg de glucosa en 1 ml de agua bidestilada, de la cual se hicieron diferentes diluciones para poder elaborar la curva de calibrado. Posteriormente se pipeteó 1 ml de la muestra problema y de cada una de las disoluciones de la solución patrón de glucosa. Cada una se llevó a un tubo de ensayo, sobre la que se añadieron 5 ml del reactivo de antrona recientemente preparado. Después de tapar los tubos y mezclar los reactivos perfectamente, se colocaron los tubos en un baño de agua hirviendo durante exactamente 12 min. A continuación, se enfriaron rápidamente hasta llegar a temperatura ambiente con ayuda de un baño de hielo picado. Se observó una coloración verde que es estable durante dos horas como mínimo. Después se transfirieron las soluciones a cubetas de vidrio de 1 cm de paso óptico y se leyeron las absorbancias de las muestras y de los patrones a

630 nm frente a los blancos preparados con los reactivos en un espectrofotómetro de barrido UV-Visible, modelo Shimadzu-2100.

Tabla III.3. Curva de calibrado de glucosa para la determinación del grado de modificación alcanzada en los complejos enzima/dextrano.

Tubos	Concentración (mg/ml)	Absorbancia ($\lambda = 630$ nm)
1	0,024	0,202
2	0,036	0,298
3	0,048	0,399
4	0,06	0,475
5	0,072	0,563
6	0,083	0,651
7	0,095	0,769

De las absorbancias de las soluciones patrón se obtuvo una recta de calibrado, de ecuación:

$$A = 7,7658 \times [\text{glucosa (mg/ml)}] + 0,0158 \quad [31]$$

$$n = 7 \quad r = 0,998 \quad R^2 = 0,997$$

$$t_{\text{exp}} = 43,266 \quad F_{1,5 \text{ exp}} = 1,872 \cdot 10^3 \quad F_{1,5 (\alpha=0,01)} = 16,26$$

Como $F_{1,5 \text{ exp}}$ es mayor que $F_{1,5 (\alpha=0,01)}$ podemos decir que el significado de la ecuación [31] es mayor del 99 % de certeza.

Con esta curva de calibrado se pudo calcular midiendo la absorbancia a $\lambda = 630$ nm la cantidad de dextrano presente en el complejo y así el grado de modificación de la muestra de partida.

2.2.2. Modificación no covalente de UAB (UABm).

Dado que las *lipasas UAB* procedían de un crudo de fermentación y por tanto eran impuras, se recurrió a un proceso de semipurificación análogo al descrito para la preparación comercial, LCRC, obteniéndose una enzima semipurificada a la que se denominó por analogía UABS. El estudio se realizó solamente con la lipasa UAB que resultó ser la más activa según se indicó en la Sección correspondiente.

Se decidió que la relación entre el preparado enzimático (UABS) y dextrano sería 40/10, como representativa del estudio previamente realizado sobre la influencia de los dextranos modificadores por uniones no covalentes a LCRC. De esta manera, se complementaba el estudio en cuanto a la influencia del peso molecular del dextrano y el grado de hidratación del derivado modificado.

El proceso de semipurificación seguido fue el mismo que el descrito para la preparación comercial¹⁸⁹ a fin de observar como influía el proceso en la capacidad sintética del preparado obtenido y en sus características de actividad enzimática y enantioselectividad. La metodología utilizada fue la antes descrita para el caso de la preparación comercial.

2.2.3. Lipasa de *Candida rugosa* comercial modificada covalentemente (LCRM).

Para la modificación química de las lipasas con dextranos es preciso la generación previa de los grupos formilo que reaccionarán con los grupos ϵ -NH₂ de las lisinas de la superficie de la proteína. Para ello, la metodología a seguir consistió en disolver 25 mg/ml de dextranos de 6 KDa

¹⁸⁹ Sánchez-Montero, J.M.; Hammon, V.M.; Thomas, D. y Legoy, M.D. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1078**, 345.

de peso molecular en agua bidestilada, se mantuvieron en agitación a 4 °C hasta su total disolución y enfriamiento. Posteriormente se añadió una cantidad de periodato de sodio que duplicase en peso a la añadida con los dextranos con el fin de asegurar una total oxidación de estos carbohidratos agitándose la mezcla durante 2 h. A continuación la solución se sometió a una diálisis con una membrana de corte de 3 KDa durante 8 h con cambios cada 2 h con el fin de asegurarnos la eliminación del periodato que no había reaccionado.

Para determinar el grado de oxidación de los dextranos se preparó una mezcla que contenía 1,5 ml de una solución de bicarbonato de sódico saturada y 1,5 ml de yoduro potásico al 10 %. A esta solución se le asignó un valor de absorbancia cero al medir a una $\lambda = 400$ nm. A continuación a esta mezcla se le añaden 200 μ l de una solución de NaIO_4 de la misma concentración que la empleada al oxidar nuestra disolución de dextranos. A esta nueva mezcla se le asigna un valor de absorbancia = 1 a $\lambda = 400$ nm. Finalmente se preparó una disolución igual a la primera pero añadiendo 200 μ l de la disolución previa a la diálisis que contenía el NaIO_4 que no había reaccionado. Se leyó la absorbancia a $\lambda = 400$ nm y ello nos dio una idea del grado de oxidación alcanzado en función del gasto de NaIO_4 . Como un mol de glucosa al oxidarse consume 2 moles de peryodato, se pueden definir los moles de dextrano oxidados.

Para provocar la unión covalente a la enzima, sobre 25 ml de la solución de dextranos oxidados se añadieron 100 mg de LCRS y la mezcla se diluyó en 25 ml de tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1 M, pH = 7. Todo ello se mantuvo agitando durante una hora a temperatura ambiente. Después se añadió una solución de 25 ml de NaBH_4 de concentración 1 mg/ml en tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1 M, pH = 7, para llevar a cabo la reducción de las bases de Schiff. Todo ello se mantuvo agitando durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente la solución final fue sometida a diálisis durante 24 h frente a agua bidestilada con una membrana

de corte de 3 KDa para eliminar el NaBH_4 que no había reaccionado. Finalmente la disolución obtenida fue congelada en acetona/ nieve carbónica y sometida a liofilización durante 24 h. Las muestras fueron almacenadas en frío para su posterior utilización.

Con una metodología análoga se realizó el mismo proceso de modificación covalente para la preparación UABS, obtenida tal y como se describió anteriormente.¹⁸⁹ La metodología seguida para obtener la enzima modificada UABM sigue el mismo proceso empleando 100 mg de UABS frente a una cantidad de dextranos de 6 KDa de peso molecular de 25 mg/ml de concentración.

A. Determinación de la cantidad de proteínas.

Para la cuantificación del porcentaje de proteínas presente en las preparaciones procedentes de la modificación covalente (LCRM y UABM) se empleó la misma metodología que en los casos anteriores.²²⁶

B. Determinación de la cantidad de polisacárido unido covalentemente.

La cuantificación de la cantidad de polisacárido unido covalentemente se realizó por el método de la antrona de Clegg,²³⁶ cuya metodología ya ha sido descrita.

C. Medida de la actividad ester sintetasa. Síntesis del oleato de heptilo.

Para determinar la actividad sintética de estos derivados se utilizó como reacción test la síntesis de oleato de heptilo. La metodología y las condiciones experimentales ya han sido

¹⁸⁹ Sánchez-Montero, J.M.; Hammon, V.M.; Thomas, D. y Legoy, M.D. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1078**, 345.

²²⁶ Hartree, E.F. (1972) *Anal. Biochem.*, **48**, 422-427.

²³⁶ Clegg, K.M. (1956) *J. Sci. Food Agric.*, **7**, 40.

descritas y para el estudio comparativo se determinó el grado de conversión en ester a las 114 h de iniciarse la reacción.

D. Desactivación térmica en medio orgánico.

Se emplearon las mismas condiciones experimentales y metodología que en los otros derivados. Con este análisis se podía observar como influía en la termoestabilidad de las preparaciones enzimáticas la modificación covalente, informando también de las posibles diferencias entre el derivado procedente de la enzima comercial (LCRM) y el procedente de UAB (UABM).

2.3. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRATACIÓN.

En la *Introducción* de esta Memoria se comentaron diversas metodologías descritas en la bibliografía para determinar el grado de hidratación de las enzimas. Dichas metodologías pueden resumirse en tres:

1. Resonancia Magnética Nuclear de protón del agua. Empleada para determinar el número de moléculas que interaccionan con la proteína en disolución. Estos datos nos van a valer como información de referencia.

2. ATG/ATD. Estas técnicas se han utilizado para determinar la cantidad de agua unida a las enzimas en estado sólido y ver las diferencias en su estado de hidratación cuando se encuentran en distintos grados de pureza.

3. Isotermas de sorción de agua. Esta técnica facilita información sobre el agua del microentorno de las enzimas liofilizadas en condiciones de reacción.

2.3.1. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DEL AGUA.

A. Principios teóricos.

La RMN de ^1H es una técnica analítica que actúa a frecuencias comprendidas en la región de radiofrecuencias. La señal obtenida es proporcional al número de núcleos que la producen y la técnica requiere una fuente de radio frecuencia y un campo magnético.

El análisis realizado se fundamenta en que la estructura terciaria de una proteína está íntimamente asociada al agua por interacciones de hidrógeno con las partes cargadas de la

proteína, lo cual crea unas esferas de hidratación con diferentes propiedades. Por el contrario, rodeando a las zonas hidrófobas de la proteína se encuentran una moléculas de agua que sólo interaccionan entre sí. La metodología empleada por nosotros tiene como objetivo poder distinguir entre los dos tipos de agua unidos al microentorno de la proteína.

B. Condiciones de análisis.

Los experimentos de resonancia magnética nuclear de ^1H se realizaron en un espectrómetro BRUKER modelo AM-360 utilizando tetrametilsilano (TMS) al 10 % en cloroformo como referencia interna y fijando una temperatura de 25 °C.

El análisis de RMN ^1H abordó los siguientes puntos:

1) Estudio de la señal de RMN ^1H del agua en los disolventes empleados como medios orgánicos en reacciones catalizadas enzimáticamente a lo largo de esta Memoria y caracterizados por su diferente hidrofobicidad expresada como $\log P$.

2) Estudio de la señal RMN ^1H del agua presente en un sistema bifásico que reproduciría las condiciones experimentales de las reacciones en medio orgánico catalizadas enzimáticamente y realizadas a lo largo de esta Memoria.

3) Estudio de la señal RMN ^1H del agua en las isoformas puras, LCRAy LCRB obtenidas a partir de la preparación comercial suministrada por la casa SIGMA.

1. RMN ^1H del agua en disolventes orgánicos.

Este experimento consistió en analizar la señal RMN ^1H de disolventes puros empleados como medios orgánicos en reacciones catalizadas enzimáticamente y que habían sido diseñadas

a lo largo de esta Memoria. Los disolventes empleados fueron los que se muestran en la Tabla IV.15. El análisis se realizó en presencia y ausencia de agua.

Tabla III.4. Valores de log P para los disolventes analizados.²³⁷

Disolventes	log P
Isooctano	5,18
Ciclohexano	3,44
1,1,1-tricloroetano	2,49
Eter diisopropílico	1,52
Isobutil metil cetona	1,31

El primer paso fue analizar una muestra de 0,5 ml de disolvente orgánico elegido sin agua y asignar las señales RMN ¹H, determinando el desplazamiento químico (δ) de cada protón.

Posteriormente y una vez que fueron identificadas las señales RMN ¹H de cada disolvente en estado puro y en ausencia de agua, se realizó la misma experiencia pero con la adición de agua a la muestra. Se tomó una muestra de 0,5 ml de disolvente a los que se le añadió 0,5 ml de agua bidestilada, se agitó vigorosamente y se analizaron las señales RMN ¹H en las mismas condiciones de análisis que cuando se trabajaba en ausencia de agua. De esta manera se pudo determinar el desplazamiento químico (δ) del protón correspondiente al agua presente en cada muestra.

2. RMN ¹H del agua en un sistema bifásico.

Este experimento se realizó con el fin de reproducir las condiciones experimentales empleadas en reacciones enzimáticas catalizadas en medio orgánico y a las que se añadía agua

²³⁷ Hansch, C.; Leo, A. y Hoekman, D. (1995) *Exploring QSAR. Hydrophobic, Electronic and Steric Constants*. American Chemical Society, Washington, DC.

al medio de reacción. De esta manera se podía realizar un estudio del agua presente en el medio y su redistribución entre las dos fases existentes; la fase acuosa, en la que estaba presente el biocatalizador y la fase orgánica compuesta por el disolvente elegido como medio de reacción.

La muestra problema se preparó a partir de 8 ml disolvente orgánico, 1 ml de agua y 0,1 g de el preparado comercial (LCRC). El disolvente de elección fue la isobutil metil cetona debido a que la identificación de la señal RMN ^1H del agua había sido optimizada y también por el interés que despertó dadas sus propiedades hidrofílicas ($\log P = 1,31$); de esta manera nos ayudaría a entender cómo es la redistribución que sufre el agua cuando forma parte de un medio orgánico en una reacción catalizada enzimáticamente donde tanto biocatalizador como disolvente compiten por el agua.

La muestra problema fue agitada a temperatura ambiente durante 10 min a 500 rpm y así provocar la interacción del agua con el disolvente, aprovechando las características hidrófilas del mismo, y por otro lado facilitar la interacción del agua con la estructura proteica y conseguir un sistema bifásico hidratado, salvando las limitaciones difusionales. Las condiciones experimentales de preparación de la muestra habían sido diseñadas previamente y nos aseguraron un sistema con un estado de hidratación suficiente como para llevar a cabo nuestro estudio.

Posteriormente se procedió al análisis del sistema estudiando por separado la fase acuosa y la fase orgánica.

a) Estudio de RMN ^1H del agua presente en la fase orgánica.

Se tomaron 0,5 ml de la fase orgánica, formada fundamentalmente por el disolvente y por parte del agua que estuviera presente en función de la hidrofilia del disolvente y de la solubilidad del agua en éste.

b) Estudio de RMN ¹H del agua presente en la fase acuosa.

Se realizó a partir de 0,5 ml de la fase acuosa, que contenía fundamentalmente la enzima y el agua que se había añadido al preparar la muestra.

3. RMN ¹H del agua unida a las isoformas puras.

Con el fin de aprovechar las ventajas de este método para la determinación del estado de hidratación, se realizaron los análisis de la señal RMN ¹H del agua presente en la isoformas puras obtenidas a partir del método de purificación descrito por Rúa y col.¹⁷²

Para ello, se prepararon las siguientes muestras:

a) *Muestra de LCRA*. Formada por 5 mg de LCRA y 50 µl de agua, con 20 µl de una referencia de TMS en agua de concentración 20 mg/ml.

b) *Muestra de LCRB*. Formada por 5 mg de LCRB y 50 µl de agua, con 20 µl de una referencia de TMS en agua de concentración 20 mg/ml.

c) *Muestra patrón*. Formada por 50 µl de agua, con 20 µl de una referencia de TMS en agua de concentración 20 mg/ml.

Los grandes espectros de RMN ¹H se realizaron en todos los casos empleando microcapilares de 50 µl introducidos en el tubo de RMN, dada la poca cantidad de proteína pura de la que se disponía.

La metodología seguida fue la misma que la empleada para las otras muestras.

¹⁷² Rúa, M.; Díaz-Mouriño, T.; Fernández, V.M.; Otero, C. y Ballesteros, A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1156**, 181-189.

2.3.2. ANÁLISIS TÉRMICO DIFERENCIAL (ATD) Y ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (ATG).

Como se ha indicado a lo largo de esta Memoria, el agua unida a una enzima desempeña un papel muy importante en la actividad biocatalítica en medio orgánico ya que es esencial para mantener la conformación catalíticamente activa de la enzima en medio orgánico.

El interés que ha despertado en nuestro grupo de trabajo el conocimiento del estado de hidratación de la proteína y cómo se dispone el agua alrededor del biocatalizador nos ha llevado a utilizar diferentes técnicas para hacer esta determinación.

Una vez conocido el estado del agua y su disponibilidad en disolución en la preparación comercial y en las isoformas puras a través de la técnica RMN ^1H (es decir, en el macroentorno de la proteína), el siguiente paso fue estudiar la preparación enzimática en estado sólido y conocer la distribución de las moléculas de agua en las zonas más próximas a la proteína (microentorno).

La preparación comercial suministrada por la casa Sigma fue el punto de partida de nuestro estudio; sin embargo, dado que esta preparación contiene impurezas que podían alterar el resultado final, se procedió a realizar una extensión de este estudio a otras preparaciones enzimáticas caracterizadas por tener diferentes grados de pureza, obtenidas a través del proceso de semipurificación para la LCRS y a través del proceso de purificación para las isoformas puras, LCRA y LCRB, ambos procesos ya explicados en la *Parte experimental*.

La técnica empleada para este estudio fue el análisis térmico gravimétrico (ATG) y el análisis térmico diferencial (ATD). Los principios en los que se basa esta técnica fueron previamente expuestos en la *Introducción*.

Las curvas de ATD y ATG se obtuvieron simultáneamente en un instrumento SEIKO 320. Se pesaron 1-10 mg de muestra, que se calentó a una velocidad de 10 °C/min hasta una temperatura final de 250 °C en corriente de nitrógeno a un flujo de 100 ml/min con α -Al₂O₃ como referencia inerte.

1. Lipasa comercial de *Candida rugosa*.

Se partió de una muestra de 10,5695 mg de LCRC, pesada en termobalanza. Se añadió como referencia 10,74 mg de alúmina. La muestra fue colocada en una capsulilla de platino destapada sobre la que se ha hecho pasar una corriente de nitrógeno a un flujo de 100 ml/min. La muestra se sometió a una rampa de temperatura consistente en calentar desde 23 °C a 250 °C a una velocidad de 10 °C/min y posteriormente fue enfriada desde 250 °C a 23 °C a una velocidad de 10 °C/min, para poder observar una posible rehidratación de la muestra al disminuir la temperatura.

2. Lactosa monohidratada.

Se pesaron 23,7957 mg de lactosa monohidratada comercial, procedente de la casa MERCK para estudiar el comportamiento de este hidrato de carbono presente en la preparación comercial de LCRC proporcionada por SIGMA. La referencia utilizada en este caso fueron 11,85 mg de alúmina. La muestra fue depositada en capsulillas de platino sobre las que se hizo pasar una corriente de 100 ml/min de nitrógeno. El calentamiento ejercido sobre la muestra fue a una velocidad constante de 10 °C/min desde 24 °C a 250 °C.

3. Lipasa de *Candida rugosa* semipurificada.

Para esta preparación se pesaron 3,7814 mg junto con una referencia de 10,47 mg de alúmina. La muestra fue depositada en capsulillas de platino destapadas sobre las que se hizo pasar una corriente de nitrógeno de 100 ml/min. El programa de temperatura en este caso consistió en un calentamiento desde 23 °C a 325 °C con una velocidad de 10 °C/min.

4. Lipasa A de *Candida rugosa*.

Se pesaron 1,0536 mg de la isoforma A de la lipasa de *Candida rugosa*. En este caso se observó que en la termobalanza el peso permanecía estable. Se añadieron 10,73 mg de alúmina como referencia. La muestra se depositó en capsulillas de platino destapadas sobre la que se pasó una corriente de nitrógeno de 100 ml/min. El programa de temperatura consistió en un calentamiento desde 22 °C a 325 °C con una velocidad de 10 °C/min.

5. Lipasa B de *Candida rugosa*.

Se partió de 1,0444 mg de la isoforma B de la lipasa de *Candida rugosa* a los que se añadieron 10,73 mg de una referencia de alúmina. La muestra se colocó en una capsulilla de platino destapada sobre la que se pasó una corriente de nitrógeno de 100 ml/min y un programa de temperatura consistente en un calentamiento desde 22 °C a 325 °C a una velocidad de 10 °C/min.

6. Lipasa UAB.

Se pesaron 9,812 mg de la lipasa UAB junto con una referencia de 11,66 mg de alúmina. La muestra se depositó en cápsulas de platino destapadas, sobre las que se hizo pasar una

corriente de nitrógeno de 100 ml/min. El programa de temperatura consistió en un calentamiento desde 20 °C a 278 °C a una velocidad de 10 °C/min.

7. Dextranos de diferente peso molecular.

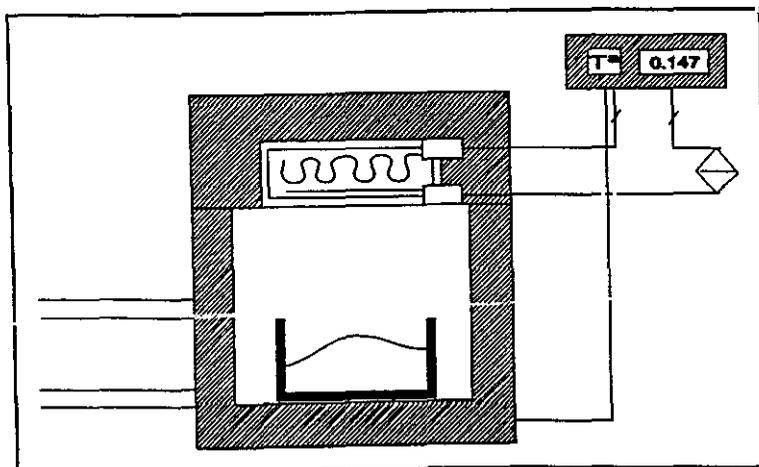
Para el análisis de los azúcares empleados como modificadores se partió de una muestra de 10,0855 mg de 10 KDa de peso molecular a la que se añadió 10,74 mg de alúmina como referencia. La muestra fue colocada en una capsulilla de platino destapada sobre la que se pasó una corriente de nitrógeno a un flujo de 100 ml/min. La rampa de temperatura consistió en un calentamiento de 23 °C a 250 °C a una velocidad de 10 °C/min para posteriormente enfriar desde 250 °C a 23 °C a una velocidad de 10 °C/min.

Para el caso de la muestra de dextranos de 50 KDa de peso molecular se pesaron 7,2516 mg y 10,74 mg de alúmina como referencia. La muestra se sometió a las mismas condiciones experimentales expuestas anteriormente.

2.3.3. ISOTERMAS DE SORCIÓN DE AGUA.

Esta técnica nos permite conocer el efecto de hidratación de una muestra proporcionando información exhaustiva del sistema en cuanto a su contenido en agua.

Esquema III.2. Captador electrónico de humedad empleado para medir la actividad de agua.



Las isotermas de sorción se han realizado en un captador electrónico de humedad modelo EBRO (ANAME), equipado con un filtro especial para disolventes orgánicos y que permite una lectura simultánea de la actividad de agua y la temperatura, la cual se fijó a $25 \pm 0,5$ °C en todos los casos mediante la termostatación de la célula de medida, a través de un baño con recirculación de agua (Esquema III.2).

Previamente a la medida experimental de las isotermas de sorción ha sido necesario la calibración del sensor higroscópico y para ello se han empleado las disoluciones patrón de actividad de agua conocida proporcionadas por la casa ANAME y sales patrón de la casa NOVASINA. Las disoluciones estaban compuestas de NaCl al 10 % de humedad relativa y NaCl al 95 % de humedad relativa. Las sales utilizadas fueron sal-11 de humedad relativa 11,3 % y sal-

98 de humedad relativa 98 % y además se han utilizado soluciones de sales de a_w conocida (Tabla III.5).

Tabla III.5. Valores de a_w para 25°C en soluciones salinas que contienen 500µl de agua.²³⁸

Sales	% Humedad relativa	g de sal/500 µl de agua
LiCl · H ₂ O	11,3	0,7
KC ₂ H ₃ O ₂ · 5H ₂ O	23,1	1,5
MgCl ₂ · 6H ₂ O	33	1,2
K ₂ CO ₃ · 2H ₂ O	43,1	0,75
Mg(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	54,3	0,8
NaCl	75,4	0,5
KCl	85,1	0,5
BaCl ₂ · 2H ₂ O	90,7	0,7
K ₂ SO ₄	94,6	0,6
H ₂ O	100	-

1. Secado del biocatalizador sólido.

Para llevar a cabo la preparación de la muestra se ha pesado una cantidad determinada de biocatalizador sólido que se ha introducido en un desecador en cuyo interior se puso P₄O₁₀ anhidro. Dicho desecador se conectó a una trompa de vacío durante dos horas a temperatura ambiente hasta conseguir un exhaustivo secado de la muestra sólida.

Para verificar la desecación de la muestra se determinó el valor de a_w en el detector de actividad de agua y se consideró que ésta estaba seca cuando el valor de a_w obtenido oscilaba entre el rango de valores 0,005 y 0,009.

²³⁸ *Analytical Chemistry* (1986) **58**, (7) 1562.

2. Secado de los disolventes.

La dificultad para desecar los disolventes orgánicos depende entre otros factores de su hidrofilia, que viene expresada en función del logaritmo del coeficiente de partición ($\log P$). De esta manera, un valor de $\log P$ bajo indica una mayor hidrofilia y por tanto el disolvente presenta mayor dificultad a la hora de secarlo.

Para el isooctano el secado se llevó a cabo partiendo de cantidades de muestra de aproximadamente 5 ml de disolvente, que se introdujeron en un desecador que contenía en su interior 10 g de pentóxido de fósforo anhidro (P_4O_{10}). La experiencia se realizó a temperatura ambiente durante aproximadamente 100 h. Para asegurar una desecación más eficaz se realizó un vacío intermitente conectando el desecador a una trompa de vacío.

El desecado del ciclohexano se realizó a partir de un litro de disolvente, que se sometió a reflujo con sodio durante 30 min. El disolvente se destiló y se recogió en un recipiente limpio y bien seco que contenía tamiz molecular de 4 Å previamente activado.

El procedimiento a seguir para la desecación del 1,1,1-tricloroetano, éter diisopropílico y la isobutil-metil-cetona consistió en tomar pequeños volúmenes de estos disolventes y llevarlos a un recipiente limpio y bien seco en cuyo interior se había colocado tamiz molecular de 4 Å previamente activado. De este recipiente se fueron sacando las muestras necesarias para llevar a cabo las experiencias a realizar con cada uno de estos disolventes.

2.3.3.1. Isoterma de adsorción de agua para la preparación enzimática liofilizada en aire.

Se pesó una cantidad determinada de preparación enzimática que previamente había sido desecada según el procedimiento descrito anteriormente hasta obtener un valor de $a_w = 0,005-0,009$, el cual consideramos como indicador de que la muestra estaba totalmente seca. Posteriormente se introdujo en la célula de medida.

A continuación se fueron añadiendo cantidades crecientes de agua a la célula de medida. Después de cada una de las adiciones y tras esperar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio termodinámico, se procedió a la lectura de a_w por cada nuevo volumen de agua que se adicionaba. La isoterma se dió por finalizada cuando el valor de a_w se aproximaba a valores comprendidos entre 0,9 y 1. Lo cual indicaba que la muestra de lipasa estaba saturada de agua.

La curva de la isoterma de adsorción de agua en aire se ha obtenido representando la variación del valor de a_w respecto a la cantidad de agua añadida por mg de muestra.

2.3.3.2. Isoterma de absorción de agua de los disolventes.

Para la realización de las isotermas de absorción en aire de los disolventes considerados se ha seguido una metodología muy similar en todos los casos estudiados.

Se partió de 1 ml de disolvente secado en la célula de medida del captor de actividad de agua, previamente termostatizada a $25 \pm 0,5$ °C. El valor de a_w obtenido se consideró como valor inicial y se fueron añadiendo cantidades crecientes de agua. Después de cada adición se esperó el tiempo conveniente hasta alcanzar el valor de equilibrio. Para evitar las pérdidas de disolvente

y agua al abrir la célula, lo cual distorsionaría la medida, se repuso después de cada medida el total de disolvente y el contenido en agua correspondiente a esa medida.

La curva de la isoterma de absorción de agua del disolvente orgánico estudiado en cada caso, se ha obtenido representando la variación del valor de a_w respecto a los μl de agua añadida por ml de disolvente.

Los disolventes empleados y su log P se muestran en la Tabla III.4.

2.3.3.3. Isoterma de sorción de agua para la mezcla de la lipasa y disolvente orgánico.

Para estudiar el comportamiento del biocatalizador cuando se encontraba en el seno de un disolvente orgánico se ha realizado la isoterma de la mezcla formada por una cantidad determinada de preparación enzimática previamente secada como se indicó en el apartado a) de esta sección y sobre la muestra se ha añadido 1 ml de disolvente previamente secado según se indicó en el apartado b), cantidad suficiente para saturar la proteína en un medio orgánico.

A continuación se procedió a la realización de la isoterma de sorción tomando como primer valor el obtenido al introducir la muestra de biocatalizador saturado en disolvente orgánico y a partir de ahí se fueron añadiendo cantidades crecientes de agua. Finalmente se procedió a la representación del valor de a_w en función de los μl de agua añadidos al sistema.

2.4. REACCIONES

2.4.1. Resolución de la mezcla racémica de ácidos (*R,S*) 2-aril propanoicos.

2.4.1.1. Esterificación de ácidos (*R,S*) 2-aril propanoicos en condiciones controladas de a_w .

Como la enzima requiere un determinado contenido en moléculas de agua, suficientes para formar la monocapa que le permite tener una configuración catalíticamente activa se ha estudiado directamente sobre una reacción de síntesis la influencia de la a_w del biocatalizador, preequilibrándolo al principio de la reacción. Para ello se han empleado disolventes de diferente hidrofobicidad como medio orgánico para que tuviera lugar el curso de la reacción, empleando además una serie de sustratos con estructura racémica para poder analizar igualmente la influencia de la a_w de preequilibrio no sólo sobre la actividad catalítica del preparado enzimático sino también sobre la enantioselectividad del mismo.

Los disolventes empleados para llevar a cabo la reacción de síntesis fueron: isooctano, ciclohexano, 1,1,1-tricloroetano, éter diisopropílico e isobutil metil cetona. Las diferencias entre ellos radican fundamentalmente en el log P (ver Tabla III.4), solubilidad del agua en el disolvente y la constante dieléctrica del mismo.

Puesto que la reacción de esterificación se ve afectada por la cantidad de agua presente en el medio, se realizó dicha reacción a diferentes valores de a_w , con lo que se aseguraba en cada caso estudiado un control de a_w sobre el proceso.

El contenido en agua se fijó mediante la equilibración del catalizador a diferentes valores de a_w conocida; y en el caso del disolvente, se añadió la cantidad de agua necesaria para llegar al valor prefijado. Ello nos permitirá afirmar que el valor de a_w de la mezcla es muy próximo al valor de a_w de partida.

Los sustratos empleados fueron (*R,S*) 2-(4.isobutilfenil) propanoico, ácido (*R,S*) 2-fenil propanoico y ácido (*R,S*) 2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico, seleccionados por dos criterios:

i) diferente hidrofobicidad (ver Tabla III.6)

ii) diferente geometría. En el caso del (*R,S*) 2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico aparecen dos anillos fusionados; mientras que la diferencia en el ácido 2-fenil propanoico y el (*R,S*) 2-(4.isobutilfenil) propanoico viene marcada por el impedimento estérico provocado por la cadena de isobutilo colocada en la posición C_4 del anillo aromático.

Tabla III.6. Valores de hidrofobicidad (π) de los sustratos empleados.²³⁷

Sustrato	π ^a
Acido 2-fenil propanoico	1,18
(<i>R,S</i>) 2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico	3,08
(<i>R,S</i>) 2-(4.isobutilfenil) propanoico	4,29

^a calculados teóricamente de las constantes fragmentarias, f_i .

a) Condiciones de reacción.

La reacción se ha llevado a cabo en un reactor sumergido en un baño a 30 °C y con agitación constante de 500 rpm. La mezcla estaba formada por el ácido (*R,S*) 2-aril-propanoico correspondiente a una concentración 66mM, y 1-propanol en concentración 66mM, ambos disueltos en un volumen final de 10 ml en el disolvente orgánico correspondiente. Se añadieron 200 mg de la lipasa comercial de *Candida rugosa* (LCRC). Se ha considerado como tiempo

²³⁷ Hansch, C.; Leo, A. y Hoekman, D. (1995) *Exploring QSAR. Hydrophobic, Electronic and Steric Constants*. American Chemical Society, Washington, DC.

inicial el momento de añadir el biocatalizador a la mezcla de reacción previamente equilibrada a una determinada a_w . A continuación se han tomado alicuotas de 100 μ l a tiempo inicial, 8, 48 y 100 horas. La reacción se detuvo a las 100 horas por congelación de la muestra.

Las condiciones de hidratación para disolvente y proteína se resumen a continuación para cada uno de los disolventes considerados a diferentes a_w .

1) Reacción de esterificación en isooctano (Tabla III.7).

Tabla III.7. Condiciones de hidratación para isooctano y LCRC.

a_w	LCRC	Disolvente (ml)	Agua (ml)
0	desechada con P_4O_{10}	10 ^a	-
0,3	equilibrada con $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	9,5	0,5
0,5	equilibrada con $Mg(NO_2)_3 \cdot 6H_2O$	9,2	0,8
0,7	equilibrada con $NaCl \cdot H_2O$	9	1
1	nativa	8	2

^a El disolvente empleado era anhidro.

2) Reacción de esterificación en ciclohexano (Tabla III.8).

Tabla III.8. Condiciones de hidratación para ciclohexano y LCRC.

a_w	LCRC	Disolvente (ml)	Agua (ml)
0	desechada con P_4O_{10}	10 ^a	-
0,4	nativa	10 ^b	-
0,7	equilibrada con $NaCl \cdot H_2O$	9,5	0,5
1	nativa	8	2

^a El disolvente empleado fue anhidro.

^b El disolvente fue de pureza analítica.

3) Reacción de esterificación en 1,1,1-tricloroetano (Tabla III.9).

Tabla III.9. Condiciones de hidratación de 1,1,1-tricloroetano y LCRC.

a_w	LCRC	Disolvente (ml)	Agua (ml)
0	desecada con P_4O_{10}	10 ^a	-
0,3	equilibrada con $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	10 ^b	-
0,5	equilibrada con $Mg(NO_2)_3 \cdot 6H_2O$	10 ^b	0,025
0,7	equilibrada con $NaCl \cdot H_2O$	10 ^b	0,05
1	nativa	8	2

^a El disolvente empleado fue anhidro.

^b El disolvente fue de pureza analítica.

4) Reacción de esterificación en éter diisopropílico (Tabla III.10).

Tabla III.10. Condiciones de hidratación del éter diisopropílico y LCRC.

a_w	LCRC	Disolvente (ml)	Agua (ml)
0	desecada con P_4O_{10}	10 ^a	-
0,3	equilibrada con $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	10 ^b	0,05
0,5	equilibrada con $Mg(NO_2)_3 \cdot 6H_2O$	9,9	0,1
0,7	equilibrada con $NaCl \cdot H_2O$	9,6	0,4
1	nativa	8	2

^a El disolvente empleado fue anhidro.

^b El disolvente fue de pureza analítica.

5) Reacción de esterificación en isobutil metil cetona (Tabla III.11).

Tabla III.11. Condiciones de hidratación de isobutil metil cetona y LCRC.

a_w	LCRC	Disolvente (ml)	Agua (ml)
0	desecada con P_4O_{10}	10 ^a	-
0,3	equilibrada con $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	9,9	0,1
0,5	equilibrada con $Mg(NO_2)_3 \cdot 6H_2O$	9,7	0,3
0,7	equilibrada con $NaCl \cdot H_2O$	9,2	0,8
1	nativa	8	2

^a El disolvente empleado fue anhidro.

b) Análisis de las muestras.

Se han tomado alícuotas de 100 µl a tiempo inicial, 8, 48 y 100 horas que se llevaron a 1,4 ml del correspondiente disolvente.

El seguimiento de la reacción enzimática se realizó mediante el análisis de los productos empleando la técnica de la cromatografía de gases, para lo cual se empleó un cromatógrafo de gases modelo SHIMADZU GC-14 A equipado con un detector de ionización de llama (FID), un inyector con split (1:2) y una columna SPB-1 SULFUR 15 m x 0,32 mm (Supelco Inc. Bellafonte, PA, EE.UU.). La temperatura del inyector fue de 300 °C y la temperatura del detector fue de 350 °C. La fase móvil empleada fue una corriente de nitrógeno. Las condiciones específicas del análisis están descritas en la Tabla III.12.

Tabla III.12. Condiciones de análisis para los ácidos 2-aril propanoicos en cromatografía de gases.

Ácido	^a T ^a col	^b f (ml/min)	^c t _R (ácido)	^d t _R (éster)
(R,S) 2-(4-isobutilfenil) propanoico	180 °C	12	4 min	5 min
(R,S) 2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico	170 °C	30	10 min	12 min
(R,S) 2-fenil propanoico	180 °C	3	5 min	6 min
(R,S) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico	165 °C	30	10 min	12 min

^a Temperatura de la columna.

^b Flujo de la fase móvil.

^c Tiempo de retención del ácido.

^d Tiempo de retención del éster.

A partir de los datos suministrados por el cromatograma, la conversión en éster se podía calcular a través del método directo o de normalización de las áreas. Sólo puede ser utilizado cuando los componentes de la muestra se eluyen en la misma columna y cuando el detector presenta igual sensibilidad para todos ellos, dando una respuesta lineal y reproducible. Estas condiciones se cumplen cuando se trata de series homólogas de solutos de alto punto de ebullición, siendo este nuestro caso. 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 de cada soluto será el porcentaje en peso del mismo en la muestra. En nuestro caso se ha utilizado siempre un detector FID que ha dado el mismo factor de respuesta en todos los casos estudiados.

Una vez que las reacciones habían llegado al tiempo final, el procedimiento para la determinación del exceso enantiomérico ha consistido en filtrar la enzima y en evaporar posteriormente el disolvente en un rotavapor. El residuo obtenido se diluyó en 25 ml de agua y posteriormente la solución se acidificó con H₂SO₄ concentrado. El ester y el ácido se extrajeron con éter dietílico (3 x 25 ml). Se separó la fase orgánica y con ella se hizo una nueva extracción con NaOH 0,1 N (3 x 25 ml). La fase acuosa obtenida se acidificó con HCl y se realizó otra extracción con éter dietílico (3 x 25 ml). La fase orgánica así obtenida se evaporó de nuevo con el rotavapor y el residuo obtenido se disolvió en 1 ml de n-hexano.

Tabla III.13. Condiciones de análisis para los ácidos 2-aril propanoicos en HPLC.

Ácido	^a Fase	^b f	^c t _R (R)	^d t _R (S)
(R,S) 2-(4-isobutilfenil) propanoico	n-hexano/2-propanol/ác.trifluoroacético (1000/10/0,1)	1	20 min	22 min
(R,S) 2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico	n-hexano/2-propanol/ác.acético (97/3/1)	0,4	45 min	50 min
Ac. 2-fenil propanoico	n-hexano/2-propanol/ác.acético (98/2/1)	0,8	20 min	23 min

^a Fase móvil empleada (v/v/v).

^b Flujo de la fase móvil (ml/min).

^c Tiempo de retención del enantiómero (R) del ácido remanente.

^d Tiempo de retención del enantiómero (S) del ácido remanente.

Para la determinación del exceso enantiomérico del ácido remanente se empleó la cromatografía líquida de alta resolución, siendo éste un método cromatográfico directo donde los dos enantiómeros del ácido remanente que no se ha esterificado son separados por una columna quiral CHIRACEL OD (Daicel Chemical Ind., Japón), cuya fase estacionaria supramolecular

deriva de la celulosa y el valor de la λ empleada en la detección UV fue de 254 nm, a temperatura ambiente. Las condiciones para cada uno de los sustratos empleados figuran en la Tabla III.13.

2.4.1.2. Esterificación de los ácidos (*R,S*) 2-arilpropanoicos empleando lipasas de *Candida rugosa* de distinto origen como biocatalizadores.

Las reacciones se llevaron a cabo con las lipasas suministradas por el grupo del Dr. Francisco Valero de la Universidad Autónoma de Barcelona, lipasas *UAB*: UAB, UAB-1000 y UAB-300, cuyas características se comentaron anteriormente (Sección I.2).

El objetivo de este experimento consistió en caracterizar estos biocatalizadores en una reacción de esterificación de ácidos (*R,S*) 2-aril propanoicos en medio orgánico y en las condiciones estándar estudiadas. Los sustratos empleados para este ensayo se caracterizaron por tener diferente polaridad y distinta geometría, tal y como se muestra en la Tabla III.14; de esta manera nos permitía conocer el centro activo de la enzima en función de la actividad y enantioselectividad que presentase cada preparación cuando estaba en contacto con cada uno de ellos, éstos fueron: el ácido (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico, el ácido (*S*) 2-fenil propanoico, el ácido (*R*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico y el ácido (*S*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico. El disolvente empleado en todos los casos fue el isooctano cuya hidrofobicidad le hacía idóneo para reacciones catalizadas por la lipasa de *Candida rugosa*.

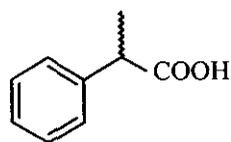
Como podemos comprobar los sustratos variaban en lipofilia y en el sustituyente presente en la posición C₂ del ácido propanoico, siendo el (*R,S*) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico el más impedido estéricamente.

Las condiciones experimentales consistieron en: ácido (*R,S*) 2-aril propanoico 66mM, *n*-propanol 66mM, 10 ml de isooctano, agitación de 500 rpm y 30 °C; esta reacción se realizó también con LCRC para comparar la actividad ester sintetasa de estas preparaciones.

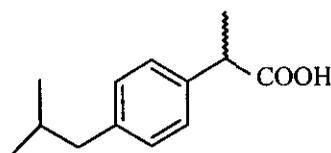
Tabla III.14. Valores de polaridad de los sustratos empleados.

Sustrato	Polaridad (π^a)
Acido 2-fenil propanoico	1,18
(<i>R,S</i>) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico	2,94
(<i>R,S</i>) 2-(4-isobutilfenil) propanoico	4,29

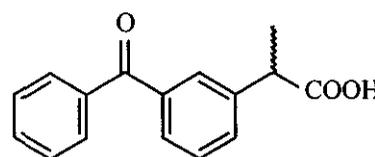
^a Calculadas teóricamente a partir de las constantes fragmentarias, f_i .²³⁷



(*R,S*) 2-fenil propanoico



(*R,S*) 2-(4-isobutil) fenil propanoico



(*R,S*) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico

Por otro lado, para profundizar en la influencia que ejerce el agua sobre las enzimas liofilizadas, se llevaron a cabo experimentos de esterificación de los isómeros puros del (*R*) y (*S*) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico. De esta manera eliminábamos la competición de sustratos y permitía disponer de un método sencillo para calcular la relación de velocidades.

Para analizar la influencia del agua al medio se emplearon las condiciones denominadas:

i) *sin agua*: medio formado por 10 ml de isooctano seco,

²³⁷ Hansch, C.; Leo, A. y Hoekman, D. (1995) *Exploring QSAR. Hydrophobic, Electronic and Steric Constants*. American Chemical Society, Washington, DC.

ii) *con agua*: medio formado por 8 ml de isooctano seco y 2 ml de agua (cantidad correspondiente a 200 μ l de agua/ml de disolvente). Estas últimas condiciones nos aseguraban trabajar a a_w próximo a 1.

A lo largo de la reacción se han tomado muestras de 100 μ l, que se han diluido hasta 1,5 ml de isooctano. El análisis de las conversiones obtenidas se realizó por cromatografía de gases. Las condiciones específicas del análisis están descritas en la Tabla III.12.

2.4.1.3. Esterificación del ácido (S) 2-(3'-benzoil)-fenil propanoico catalizada por LCRC empleando cosolventes como miméticos del agua.

En una reacción de esterificación se produce agua en mayor o menor medida y por tanto se produce un desplazamiento del equilibrio. Para evitar este efecto negativo, se propuso una nueva estrategia que consistió en el empleo de pequeñas cantidades de disolventes polares que *mimetizan* la acción del agua.

Para estudiar este aspecto con la LCRC se llevaron a cabo reacciones de esterificación del (R) o (S) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico con n-propanol empleando 200 mg de enzima y distintos disolventes. Las condiciones de reacción empleadas fueron: una concentración de (S) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico 66mM disuelta con n-propanol en cantidades equimoleculares en un volumen final de 10 ml de disolvente orgánico. La reacción fue catalizada por LCRC, 20 mg de preparado enzimático/ml de disolvente. Se trabajó a una $T^a = 30$ °C y con una agitación de 500 rpm. Se emplearon diferentes cantidades de alcoholes.

Para el análisis de las muestras se han tomado alícuotas de 100 μ l a diferentes tiempos a lo largo de la reacción que se llevaron hasta 1,5 ml con isooctano y a continuación se analizaron.

El análisis se ha realizado en un cromatógrafo de gases modelo SHIMADZU GC-14A cuyas características ya han sido descritas; las condiciones de análisis específicas para el (*R,S*) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico fueron expuestas en la Tabla III.12.

2.4.1.4. Esterificación del ácido (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico empleando biocatalizadores modificados con dextranos.

Como se comentó en la Introducción de esta Memoria, la presencia de polisacáridos unidos a la enzima liofilizada aumenta la estabilidad de la enzima. Así mismo, dada su naturaleza polihidroxilica también son candidatos para actuar como mimetizadores del agua. Es por ello por lo que se prepararon diversos complejos dextrano/lipasa.

A través de la reacción de esterificación del (*R,S*) 2-(4.isobutilfenil) propanoico se ha podido hacer un seguimiento más exhaustivo de la influencia que ejercen estos modificadores sobre el balance hidrofóbico/hidrofílico de la superficie de la proteína y por tanto en la actividad catalítica de la misma.

Las condiciones de reacción empleadas fueron: (*R,S*) 2-(4.isobutilfenil) propanoico 66mM con n-propanol 66 mM en 10 ml de disolvente. Se empleó una T^a de 30 °C a una velocidad de agitación de 500 rpm y se emplearon diferentes cantidades de agua. Esta misma reacción se llevó a cabo con la preparación UAB en una proporción enzima/dextrano de 40/10 empleando los dextranos de diferente peso molecular.

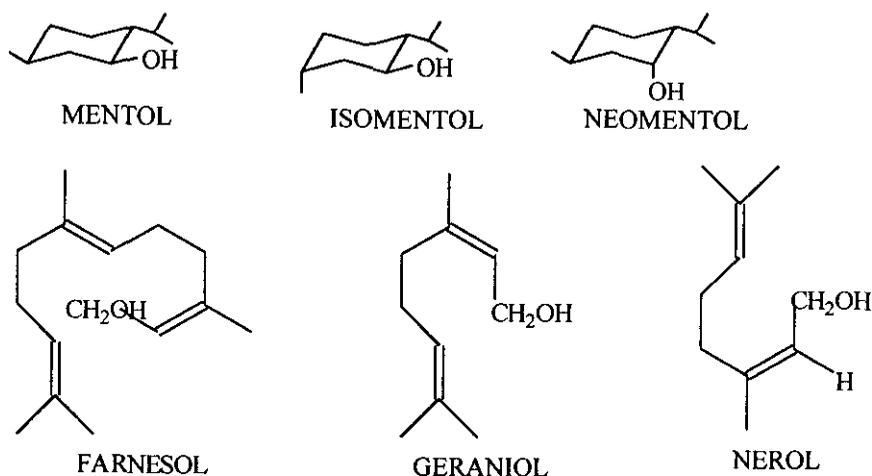
A lo largo de la reacción se fueron tomando muestras de 100 μ l que se diluyeron hasta 1,5 ml de disolvente orgánico para su posterior análisis. La conversión obtenida se determinó por cromatografía de gases. Las condiciones fueron las expuestas en la Tabla III.12.

Los datos de excesos enantioméricos se detectaron por HPLC tal y como aparece descrito en la Tabla III.13 del Apartado 1.

2.4.2. Transesterificación de alcoholes terpénicos vía síntesis enzimática.

La reacción de transesterificación se ha realizado con terpenos de diferente naturaleza estructural (Esquema III.3):

Esquema III.3. Estructura de los terpenos empleados.



- monoterpenos acíclicos: *nerol*, *geraniol*,
- monoterpenos monocíclicos: *mentol*, *isomentol* y *neomentol*,

- sesquiterpenos acíclicos: *farnesol*.

Se procedió a la síntesis de ésteres de terpenos a través de una reacción de transesterificación catalizada por cada una de las preparaciones enzimáticas puestas a punto en esta Memoria.

Se escogió el acetato de vinilo como mejor agente acilante²³⁹ ya que el alcohol vinílico liberado, tautomeriza a acetaldehído. En todos los casos se utilizaron concentraciones equimoleculares de reactivos.²⁴⁰

La reacción de transesterificación se realizó en reactores en los que se utilizan concentraciones 0,1M del terpeno correspondiente y 0,1M del acetato de vinilo en un volumen final de 10 ml de n-hexano; asimismo se guardó el orden de adición de los reactivos. Añadiendo sobre el disolvente, los reactivos y finalmente la enzima.²⁴¹ La mezcla de reacción se mantuvo en un baño termostatizado a 30 °C y con agitación constante de 500 rpm.

Como disolvente orgánico se optó por el hexano cuyo log P = 3,5 que estaba dentro de los requisitos que según la bibliografía eran necesarios para obtener buenos resultados en este tipo de reacciones enzimáticas.^{242,243}

De la misma manera para todos los terpenos utilizados se realizó un ensayo en blanco de la reacción en ausencia de preparado enzimático y en las mismas condiciones experimentales.

²³⁹ Akoh, C. y Yee, L. (1998) *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **4**, 149-153.

²⁴⁰ Claon, P. y Akoh, C. (1994) *Biotechnol. Lett.*, **16(3)**, 235-240.

²⁴¹ Claon, P. y Akoh, C. (1993) *Biotechnol. Lett.*, **15(12)**, 1211-1216.

²⁴² Wu, W.; Akoh, C. y Phillips, R. (1996) *Enzyme Microb. Technol.*, **18**, 536.

²⁴³ Claon, P. y Akoh, C. (1994) *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 835-838.

Se tomaron periódicamente alícuotas de 100 µl que se diluyeron en 1 ml de hexano que contenían 1,746 mg de caproato de etilo como patrón interno. Posteriormente las muestras se pasaron por una columna de sulfato sódico anhidro (Na₂SO₄) para retirar el agua residual y la enzima. Para las muestras que no contenían enzima las alícuotas se diluyeron en 1 ml de n-hexano antes de ser analizadas.

Tabla III.15. Tiempos de retención en minutos para los terpenos utilizados y sus correspondientes ésteres.

Terpeno	t _r (alcohol)	t _r (ester)
Mentol	10,2	15
Isomentol	11,5	16,8
Neomentol	10,2	16,1
Nerol	13,5	18,1
Geraniol	14,8	19,3
Farnesol	9,7	13,5

Los productos de reacción se analizaron por cromatografía de gases. Las condiciones de análisis fueron una relación de split (1:2) y una columna SPB-1 SULFUR 15 m x 0,32 mm (Supelco Inc. Bellafonte, PA, EE.UU.). La temperatura del inyector fue de 200 °C y la temperatura del detector fue de 250 °C. La fase móvil empleada fue una corriente de nitrógeno a 0,75 Kg/cm² y con un flujo de split de 45 ml/min. Se empleó un programa de temperaturas con una temperatura inicial de la columna a 110°C hasta la aparición de la señal del alcohol (ver Tabla III.15). Posteriormente se elevó la temperatura a 10°/minuto hasta 150°C manteniéndose después ésta durante 10 minutos para así adelantar la aparición de la señal del ester. Los tiempos de reacción para cada uno de los terpenos y los correspondientes esteres fueron los que aparecen en la Tabla III.15.

2.5. MODELIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENZIMA-SUSTRATO.

La estructura de difracción de Rayos X utilizada en la resolución de esta Memoria se encuentra depositada en el Protein Data Bank de Brookkaven y se identifica como PDB1CRL. Los cálculos de minimización de energía y de dinámica molecular de la proteína se han realizado utilizando el propuesto por Hyperchem 5.1 Pro. Como paso previo se procedió a la relajación de la energía de todo el sistema mediante minimización de la energía utilizando el algoritmo de minimización *steepest-descendent* a un valor de convergencia de 0,1. El sistema inicial se encuentra constituido por 7500 átomos.

El anclaje del sustrato en el centro activo se hizo manualmente de tal forma que cumpliera los requerimientos necesarios para simular el intermedio tetrahédrico denominado (Td1). Este intermedio tetrahédrico implica que el sustrato se sitúa en el centro activo de la lipasa, de tal manera que, el carbono carbonílico toma contacto con el grupo -OH de la Serina-209. El protón del grupo hidroxílico de la Ser-209 se transfiere al N de la Histidina-449 de la triada catalítica y el O γ de la Ser-209 con carga negativa ataca nucleofílicamente al grupo carbonilo del sustrato, con lo que se produce el intermedio tetrahédrico anteriormente citado.

2.5.1. Elección de la zona de interacción con el sustrato.

En primer lugar se definió un volumen alrededor del centro activo, concretamente un conjunto de aminoácidos en el que estarían incluidos la maquinaria catalítica compuesta por Ser-209, His-449 y Glu-341 diversos residuos oxianiónicos estabilizantes como Gly-124, Gly-123 y Ala-210.

Los puntos básicos son:

- a) los sustituyentes voluminosos del sustrato se sitúan en el tunel del centro activo,
- b) los sustituyentes voluminosos y lipófilos se orientan hacia los residuos hidrofóbicos que se encuentran en el centro activo, Phe-345, Phe-415 y Phe-296.

Otro aminoácido que constituye el túnel aunque no está directamente implicado en la interacción es la Leu-297.

2.5.2. Estructura de los compuestos libres.

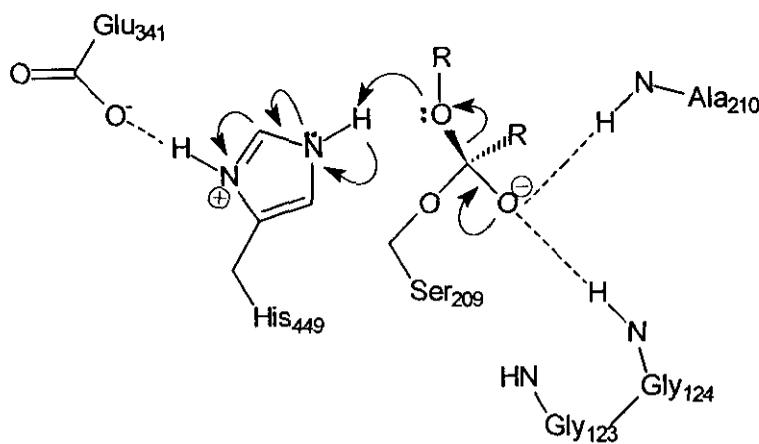
Como paso previo al anclaje de los sustratos modelo utilizados en esta Memoria (*S*) y (*R*) 2-(3'-benzoil)-fenil propanoico (ketoprofeno) se procedió a su construcción con el módulo *Build* del programa Hyperchem 5.1 Pro de la casa Hypercube.

Una vez obtenido el módulo tridimensional se procedió a la optimización de su geometría con el algoritmo de minimización Amber fijando un criterio de convergencia de 0,01.

2.5.3. Formación del complejo acil-enzima.

Una vez realizada la minimización de la energía del sustrato se ancló en el centro activo de la lipasa de *Candida rugosa* siguiendo el esquema adjunto.

Esquema III.4. Formación del complejo acil-enzima.



2.5.4. Metodología de cálculo.

La metodología utilizada ha sido la siguiente:

1) Minimización de las coordenadas iniciales para evitar interacciones de Van der Waals desfavorables. Se utilizó para ello el algoritmo de minimización *steepest-descent* hasta un valor de convergencia de $0,1 \text{ Kcal/mol}\cdot\text{Å}$. Esta estructura constituyó el punto de partida de la siguiente etapa del proceso.

2) Cálculo mediante dinámica molecular del espacio conformacional del complejo enzima-ketoprofeno. El cálculo se ha realizado utilizando los dos isómeros del ketoprofeno (*R* y *S*).

Obviamente, el tamaño del sistema a estudiar es una de las limitaciones para la simulación mediante dinámica molecular. Debido al gran tamaño del sistema objeto de estudio, fue necesario restringir la zona debido a que las herramientas de cálculo empleadas imposibilitaron un estudio que incluyera todos y cada uno de los átomos del sistema.

La estrategia seguida para realizar la dinámica se basa en que para obtener el margen mínimo de conformeros representativos en el espacio de energía conformacional del sistema se tomaron como condiciones iniciales un calentamiento del sistema desde 300 °K hasta 800 °K que fue de 1 ps. El sistema se mantuvo a esta temperatura durante 5 ps y finalmente se enfrió a 300 °K en 1 ps.

La adquisición de datos se realizó en el tramo correspondiente a la zona de 800 °K. De la dinámica se tomaron valores de energía, temperatura y variación de energía en función del tiempo en picosegundos. Los datos de la energía en función del tiempo se ajustaron a una función polinómica de grado 10 y los mínimos constituyeron las poblaciones de conformeros más representativos del sistema, las cuales fueron a continuación sometidos a un paso de relajación mediante la aplicación de mecánica molecular con el algoritmo *steepest-descent* hasta un criterio de convergencia de 0,1 ps. Este paso tuvo como objeto relajar la energía del sistema a fin de evitar tensiones innecesarias y por tanto impedir la obtención de artefactos matemáticos (como por ejemplo, un anillo bencénico doblado) los cuales no tienen sentido químicamente hablando.

Una vez terminado este paso, se procedió al enfriamiento del sistema desde 800 °K hasta 500 °K durante un ps. El sistema se mantuvo a esta temperatura durante 5 ps y se enfrió a 300 °K durante un ps. Igual que ocurrió anteriormente la representación de la energía en función del tiempo y el ajuste posterior a una función polinómica nos dio los mínimos representativos del

sistema. Esta minimización constituyó la población de confórmeros de 500 °K. Posteriormente se relajaron mediante mecánica molecular y se pasó a la siguiente fase de enfriamiento.

Desde 500 °K se enfriaron a 300 °K en un ps. El sistema se mantuvo a 300 °K durante 5 ps comprobando que la variación de temperatura no superaba el 10 % de la temperatura elegida. Finalmente se pasó de 300 °K a 275 °K durante 1 ps. La adquisición de datos se tomó en la zona correspondiente a la estabilización del sistema que fue de 5 ps. El ajuste de los valores de energía en función del tiempo nos dio los mínimos correspondientes que constituyeron el grupo de confórmeros finales y representativos del espacio conformacional de la molécula. Estos confórmeros se relajaron mediante la utilización de la mecánica moléculas utilizando el algoritmo *steepest-descent* hasta un valor de convergencia de 0,1 ps.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACIÓN DE LAS LIPASAS.

En esta Sección se procede a realizar una discusión conjunta de las características de las preparaciones enzimáticas utilizadas a lo largo de esta Memoria; el enfoque se ha realizado en base a estudiar las posibles diferencias y analogías entre cada preparado desde el punto de vista de su contenido en proteínas, actividad hidrolítica, actividad sintética a 30° y 50 °C y la estabilidad en medio orgánico a 30° y 50 °C.

A. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA.

Como ya se comentó en la *Parte experimental*, la cantidad de proteína se determinó por el método descrito por Hartree.²²⁶ Esta determinación nos permitió, a partir de los ensayos de actividad correspondientes, valorar y comparar la eficacia catalítica de cada una de las preparaciones enzimáticas estudiadas a lo largo de esta Memoria, respecto a la preparación comercial suministrada por la casa SIGMA. De esta manera, los cálculos obtenidos se podían referir a la cantidad de proteína presente en cada preparado y obtener de esta manera resultados más relevantes que nos dieran una idea más clara de las posibles diferencias que pudiera haber entre cada preparado.

Para la determinación de la concentración de proteína de las muestras empleadas se siguió el procedimiento indicado en la Sección III.2.1.1.A y se aplicó en cada caso la recta de calibrado de la Figura III.1 (ecuación [23]). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados

²²⁶ Hartree, E.F. (1972) *Anal. Biochem.*, **48**, 422-427.

obtenidos para cada una de las preparaciones se muestran en la Tabla IV.1:

Tabla IV.1. Cantidad de proteínas (%) determinadas por el Método Hartree.²²⁶

Lipasas	% Proteínas
LCRC	18
LCRS	58
UAB	14
UABS	70
UAB-1000	12,5
UAB-300	5,3

En primer lugar se puede observar la diferencia existente entre la preparación comercial, LCRC con un 18 % de proteínas y la preparación semipurificada, LCRS con 58 %.

El método de semipurificación basado en la diálisis y posterior liofilización a partir de la LCRC según está descrito en la Sección III.2.1.2. permitió obtener derivados donde la pérdida de peso a partir del preparado comercial alcanzaba hasta un 380 %. En consecuencia, el derivado obtenido, libre de impurezas y con un mayor contenido proteico, es indicativo de que este método permite la obtención de un preparado con un grado de purificación aproximado de 330 %.

Estos datos coinciden cualitativamente con los indicados por Hernáiz y col.¹⁴⁸ y con los indicados por Sánchez-Montero y col.¹⁸⁹ y que eran atribuidos a una alteración del microentorno de la lipasa semipurificada después de la diálisis, que elimina lactosa fundamentalmente, lo cual provocaba una pérdida de agua al eliminarse este hidrato de carbono que actúa como mimético del agua y como reserva de agua en la enzima comercial estabilizando y activando la enzima

²²⁶ Hartree, E.F. (1972) *Anal. Biochem.*, **48**, 422-427.

¹⁴⁸ Hernáiz, M.J.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1996) *Biotechnol. Tech.*, **10**, 917-922.

¹⁸⁹ Sánchez-Montero, J.M.; Hammon, V.M.; Thomas, D. y Legoy, M.D. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1078**, 345.

liofilizada en el medio orgánico inmiscible en agua.

Respecto a las lipasas UAB vemos que según las condiciones de fermentación se obtienen distintas cantidades de proteína. En general diremos que velocidades de agitación bajas (500 rpm) en el proceso de fermentación producen mayor cantidad de proteína (UAB y UAB-1000) que altas velocidades de agitación. La cantidad de proteína de las muestras UAB y UAB-1000 es ligeramente inferior a la de la proteína comercial de Sigma (LCRC), que era de un 18 % como se indicó anteriormente.

Esta magnitud condiciona la aireación del cultivo, si se mantiene, como fue el caso, todas las demás variables constantes. Tal y como aparece descrito en la bibliografía, la producción de lipasas es muy superior en cultivos realizados con agitación en comparación a la obtenida en cultivos estacionarios.^{244,245} No obstante la agitación y por ello la aireación, tienen un efecto variable sobre la producción de lipasa y depende del microorganismo. Los microorganismos que siguen un patrón como el observado para la *Candida rugosa* son: *P. fragi*,²⁴⁶ *P. aeruginosa* y *Rh. Oligosporus*.²⁴⁷

El método de semipurificación aplicado a la lipasa UAB condujo a un derivado con 70% en proteína. Así pues el método de semipurificación aumenta la cantidad de proteínas, si bien el aumento es diferente del observado con LCRC debido a las diferentes condiciones de fermentación.

En el caso de los derivados modificados la cantidad de proteína presente estaba

²⁴⁴ Alford, J.A. y Schmith, J.L. (1965) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 1038-1042.

²⁴⁵ Eitenmiller, R.R.; Vakil, J.R. y Shahami, K.M. (1968) *J. Dairy Sci.*, **51**, 940-942.

²⁴⁶ Nashif, S.A. y Nelson, F.E. (1953) *J. Dairy Sci.*, **36**, 471-480.

²⁴⁷ Ghosh, P.K.; Saxena, R.K.; Gupta, R.; Yadar, R.P. y Davidson, S. (1996) *Sci. Progr.*, **79**, 119-157.

condicionada al grado de modificación alcanzado, que determinaba la cantidad de azúcar presente en la muestra. En un principio se abordó el estudio de la modificación no covalente a partir de la lipasa semipurificada de *Candida rugosa*, debido a que ensayos realizados sobre la preparación comercial condujeron a resultados irreproducibles. De este forma se obtuvieron preparados modificados en diferente grado y con dextranos de distinto peso molecular. Los resultados obtenidos en la determinación de la cantidad de proteínas se muestran en la Tabla IV.2.

Tabla IV.2. Cantidad de proteínas (%) determinadas por el Método Hartree²²⁶ de los derivados modificados no covalentemente obtenidos a partir de LCRS.

Dextranos (Da)	Relación	% proteína
6.000	40/10	46,5
	40/20	38,7
	40/30	33
12.000	40/10	47
	40/20	38
	40/30	33,5
25.000	40/5	55
	40/10	46,5
	40/20	36
50.000	40/5	54
	40/10	35
	40/15	16

Obviamente, las enzimas modificadas tienen un menor porcentaje de proteína que la LCRS de partida (58 %).

Podemos observar que el peso molecular del dextrano no influye significativamente en

²²⁶ Hartree, E.F. (1972) *Anal. Biochem.*, **48**, 422-427.

la mayor o menor cantidad de proteínas presente en los preparados obtenidos con el mínimo grado de modificación, salvo en el caso del dextrano de peso molecular elevado (50 KDa). El factor condicionante del contenido proteico del derivado es la relación LCRS/dextrano. A mayor relación enzima/azúcar modificador hay mayor cantidad de proteínas.

En el caso de las preparaciones obtenidas a partir de la lipasa UAB sometida a modificación no covalente, la única relación estudiada fue la de 40/10 debido a que se comprobó que el peso molecular del dextrano no afectaba a la cantidad de proteína y esta relación de enzima/dextrano era representativa de la influencia de la modificación no covalente. El porcentaje de proteína de las preparaciones obtenidas fue en todos los casos de $70 \pm 0,2$ %, similar al de la proteína de partida.

Por otro lado, al determinar la cantidad de proteínas del derivado modificado covalentemente con dextrano los resultados se muestran en la Tabla IV.3.

Tabla IV.3. Cantidad de proteínas (%) de los derivados modificados covalentemente determinadas por el Método Hartree.²²⁶

Derivado	% proteínas
LCRM	62
UABM	73

La LCRM con un 62 % de proteínas, procede de una preparación de la LCRS, con un 58 % de proteína, quedando esta diferencia dentro del error experimental; lo mismo ocurre con la UABM, con un 73 % de contenido proteico, que procede de la preparación semipurificada de UAB (UABS), con aproximadamente un 70 % de proteínas.

²²⁶ Hartree, E.F. (1972) *Anal. Biochem.*, **48**, 422-427.

B. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA.

El siguiente paso en la caracterización enzimática fue la determinación de la actividad hidrolítica, para lo cual se emplearon glicéridos de ácidos grasos de diferente longitud de cadena. Los resultados obtenidos para cada una de las preparaciones enzimáticas con distinto grado de purificación utilizadas en esta Memoria se muestran en la Tabla IV.4.

Tabla IV.4. Comparación de las actividades hidrolíticas ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína) de la lipasa de *Candida rugosa* en distintos grados de purificación. La actividad lipásica está determinada a partir de la hidrólisis de tributirina. La actividad esterásica se ha determinado utilizando como reacción test la hidrólisis del acetato de p-nitrofenilo.¹⁸⁵

Lipasa	Actividad lipásica ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína)	Actividad esterásica ¹⁸⁵
LCRC	2,83	263 *
LCRS	2,22	207 *
LCRA	253	$14 \cdot 10^3$
LCRB	290	$19 \cdot 10^3$

* U/mg de preparado.

En la Tabla IV.4 se muestran las actividades lipásicas obtenidas en preparaciones con distinto grado de purificación. Puede observarse que la lipasa comercial presenta mayor actividad lipásica que la semipurificada, fenómeno que ya había sido descrito anteriormente.¹⁸⁹

Respecto a los extractos obtenidos tras el proceso de purificación, LCRA y LCRB, fueron sometidos a una diálisis seguida de liofilización para eliminar la presencia de iones procedentes del proceso.¹⁸⁵ Los resultados muestran que ambas isoenzimas presentan mayor actividad esterásica que lipásica y que la LCRB tiene mayor actividad hidrolítica frente a tributirina que

¹⁸⁵ Hernáiz, M.J. *Tesis Doctoral* (1996) Universidad Complutense. Madrid.

¹⁸⁹ Sánchez-Montero, J.M.; Hammon, V.M.; Thomas, D. y Legoy, M.D. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1078**, 345.

la LCRA.

En la Tabla IV.5 se muestran los resultados obtenidos al caracterizar las *lipasas UAB* comparándolos con los pertenecientes al preparado comercial.

Tabla IV.5. Comparación de la actividad hidrolítica de las lipasas UAB con el preparado comercial.

Lipasa	Actividad ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg prot}$)	
	Trioleína	Tributirina
LCRC	2,1	2,82
LCRS	1,81	2,22
UAB	0,136	6,97
UAB-1000	0,216	0,35
UAB-300	0,181	3,96

Tal y como se muestra en la Tabla IV.5, la actividad por mg de proteína de la LCRS en la hidrólisis de tributirato de glicerilo es algo superior a la que presenta la LCRC. Puede observarse que en este caso hay una mayor actividad frente a triglicéridos de cadena corta que frente a triglicéridos de cadena larga. Así mismo observamos que los valores obtenidos por mg de proteína son semejantes a los del preparado comercial, lo que indicaría que en este proceso de semipurificación se han eliminado sustancias no activas catalíticamente hablando.

Si se analizan los resultados obtenidos con las lipasas UAB, se pone de manifiesto la gran diferencia de actividades hidrolíticas de las lipasas obtenidas en distintas condiciones de fermentación y purificación. Con la lipasa comercial puede observarse que la actividad hidrolítica frente a la tributirina es mayor que frente a la trioleína. Debemos indicar que la baja cantidad de proteína que posee la muestra UAB-300 (5,3 %) hace que los resultados con ella obtenidos estén sujetos a un gran error y su análisis no sea estrictamente muy válido.

La diferencia de comportamiento observada entre UAB-1000 y UAB radica fundamentalmente en el tratamiento previo a la liofilización, ya que ambos preparados poseen aproximadamente la misma cantidad de proteína (Tabla IV.1). Este tratamiento consistía en el caso de la UAB en un proceso de diálisis en presencia de lactosa. El efecto positivo de la presencia de lactosa en el preparado de lipasa liofilizado ya fue descrito por Sánchez-Montero y col.,¹⁸⁹ pudiendo decir que en el caso de estas enzimas (UAB y LCRC) es determinante de su actividad hidrolítica de triglicéridos de ácidos de pequeño tamaño.

Este efecto no se observa por el contrario en el caso de la hidrólisis de trioleína. Así pues, según el sustrato, la actividad relativa de la lipasa UAB y UAB-1000, así como del preparado comercial de Sigma (LCRC) es diferente, lo cual apunta a una diferente proporción de isoformas de la lipasa de *Candida rugosa*.

Para confirmar la hipótesis indicada anteriormente, se determinó la cantidad de isoformas que tenía cada preparación mediante la técnica de FPLC empleada por la Dra. Rúa de la Universidad de Orense. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla IV.6.

Tabla IV.6. Porcentaje de isoformas de la LCRC y de las preparaciones UAB determinada por FPLC.

Preparado enzimático	LIP 3	LIP 1	LIP 2
LCRC	83	17	-
UAB	57	-	42
UAB-1000	43	-	57
UAB-300	57	-	43

De los datos de la Tabla IV.6 se deduce que mientras la LCRC tiene como componente

¹⁸⁹ Sánchez-Montero, J.M.; Hammon, V.M.; Thomas, D. y Legoy, M.D. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1078**, 345.

principal (según el análisis FPLC) la LCRA (LIP 3, ver Tabla I.6 de la *Introducción*), las lipasas suministradas por el grupo del Dr. Valero tienen una proporción similar de las isoformas (LIP 3 y LIP 2).

La asignación de las isoformas se hizo por comparación con otras muestras suministradas a la Dra. Rúa por el grupo del Dr. Valero de la Universidad Autónoma de Barcelona. Debemos hacer mención especial a que la lipasa comercial de Sigma (LCRC), con la que hemos trabajado, tiene como componente principal, la LIP 3 (Lipasa A) diferente de lo descrito hasta ahora en la bibliografía donde se indicaba que la lipasa mayoritaria era LIP 1, asociada a la Lipasa B.¹⁷² Ello deberá atribuirse a diferentes condiciones de fermentación del lote comercial que hemos usado y los usados por otros autores, si bien el suministrador comercial es el mismo.

López y col.²³³ han demostrado que variando la velocidad de alimentación o la velocidad de crecimiento se obtienen lipasas crudas con diferente relación LIP 3/LIP 2 y en consecuencia, biocatalizadores con diferente actividad hidrolítica.

Teniendo presente estos datos y los de la Tabla IV.5, podemos deducir que las lipasas LIP 1, LIP 2 y LIP 3 tienen distinta actividad hidrolítica.

Así tendríamos que la LIP 1 es la más activa en la hidrólisis de trioleína ya que la LCRC presenta una gran actividad catalítica frente a este sustrato, lo cual está de acuerdo con los últimos resultados de Otero y col.¹⁸⁷ que indican un mayor impedimento estérico en el subsitio

¹⁷² Rúa, M.; Díaz-Mouriño, T.; Fernández, V.M.; Otero, C. y Ballesteros, A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1156**, 181-189.

²³³ López, S.; Valero, F. y Solá, C. (1996) *Applied. Biochem. Biotechnol.*, **59**, 15-24.

¹⁸⁷ Otero, C.; Castro, R.; Screa, J. y Caldararu, H. (1998) *J. Phys. Chem. B*, **102**, 8611-8.

de la Lipasa A (LIP 3) que en el de la Lipasa B (LIP 1), y con los de Hernáiz y col.,¹⁴⁸ que indican que la LIP 1 (Lipasa B) es más activa que la LIP 3 (Lipasa A) en la hidrólisis de ácidos aril-propiónicos de gran tamaño molecular.

Por el contrario LIP 3 (Lipasa A) y LIP 2 serían poco activas frente a la trioleína (baja conversión observada con la lipasa UAB comparada con LCRC) y elevada frente a tributirina.

Por último, indicar que el tratamiento de la lipasa cruda con lactosa (lipasa UAB) favorece la actividad hidrolítica del preparado, frente a la precipitación con etanol, que deberíamos considerar desnaturizante. Ello se deduciría a partir de las lipasas UAB y UAB-1000, con similar cantidad de proteína y proporciones relativas de LIP 3 y LIP 2.

C. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ESTER SINTETASA.

La medida de la actividad ester sintetasa se realizó utilizando como reacción test la síntesis del oleato de heptilo.

Las condiciones experimentales y la metodología seguida se expusieron en la *Parte experimental* de esta Memoria. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente Tabla IV.7.

Como podemos comprobar la actividad ester sintetasa es superior en las preparaciones puras y dentro de estas es la LCRB (LIP 1) la que presenta mayor actividad que la isoforma LCRA (LIP 3).¹⁸⁵ Igualmente la preparación comercial (LCRC) presenta más actividad que la

¹⁴⁸ Hernáiz, M.J.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1996) *Biotechnol. Tech.*, **10**, 917-922.

¹⁸⁵ Hernáiz, M.J. (1996) *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid.

preparación semipurificada (LCRS) debido a que el proceso de diálisis elimina lactosa, con la consiguiente pérdida de actividad. Este resultado ya fue puesto de manifiesto por Sánchez-Montero y col.¹⁸⁹

Tabla IV.7. Actividad ester sintetasa en la esterificación de ácido oleico con heptanol de las preparaciones enzimáticas. Condiciones de reacción: [heptanol] = [ácido oleico] = 66mM, 10 ml de isoctano, 100 mg de derivado enzimático, 30 °C y 500 rpm de agitación.

Lipasas	Actividad (mmol ester/mg prot·h)
LCRC	0,034
LCRS	0,025
LCRA	0,048
LCRB	0,06
UAB	0,01
UAB-1000	$7,8 \cdot 10^{-3}$
UAB-300	$4,5 \cdot 10^{-3}$

Respecto a las *lipasas UAB* comprobamos que las preparaciones UAB y UAB-1000, obtenidas a baja velocidad de agitación, dan un patrón de actividad semejante. Así podemos decir que el tratamiento posterior de la enzima cruda con lactosa no parece afectar en este caso en la catálisis de la síntesis de oleato de heptilo o en la hidrólisis de trioleína y sí en la hidrólisis de tributirina como podemos observar en la Tabla IV.5. Por otro lado, la baja actividad obtenida tanto en hidrólisis (Tabla IV.5) como en síntesis (Tabla IV.7) de la UAB-300 indica que altas velocidades de agitación en el fermentador dan lipasas menos activas tanto en hidrólisis como en síntesis. Sin embargo, dado el bajo porcentaje de proteínas de este preparado, este dato ha de

¹⁸⁹ Sánchez-Montero, J.; Hammon, V.; Thomas, D. y Legoy, M. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1078**, 345.

ser tomado con reserva.

Así mismo, se realizó el mismo ensayo con los derivados modificados covalentemente con dextranos de 6KDa, procedentes de la preparación LCRM y UABS. En este caso se determinó la actividad sintetasa a un tiempo final de 114 h. Los resultados aparecen en la Tabla IV.8.

Tabla IV.8. Conversión (%) en oleato de heptilo a las 114 h de reacción. Condiciones de reacción: [heptanol] = [ácido oleico] = 66mM, 10 ml de isooctano, 30 mg de LCRM, 26 mg de UABM, 30 °C y 500 rpm de agitación.

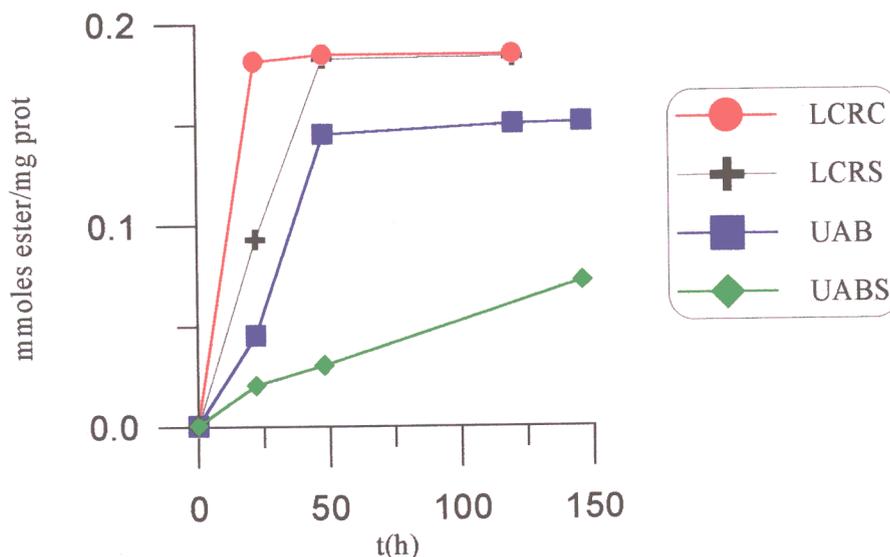
Derivado	% conversión	mmoles ester/mg preparado
LCRM	32,61	0,055
UABM	90	0,176

Del análisis de estos resultados comprobamos que la actividad sintetasa es superior en el derivado UABM que el obtenido a partir del derivado comercial. Con la modificación covalente hemos obtenido un preparado en el que se mejora la actividad debido posiblemente a la estabilización de la estructura provocada por la unión al dextrano. Aquí el dextrano actuaría como un escudo hidrófilo que protege a la proteína de la desnaturalización provocada por el medio orgánico. Es por ello por lo que los valores de actividad con LCRM y UBM son mayores que los obtenidos con la enzima sin modificar (Tabla IV.7). Así pues, esta modificación, estabiliza los biocatalizadores cuando se trabaja en medios orgánicos (isooctano) a largos tiempos de reacción (114 h).

Por otro lado, se empleó esta reacción de síntesis de oleato de heptilo como test para estudiar la influencia que tenía la temperatura en la actividad sintetasa de los preparados ensayados. Para ello, y tal como se describió en la *Parte experimental*, se trabajó a 50 °C empleando las mismas condiciones de reacción y metodología de análisis ya descritas. En la

Figura IV.1 se comparan las enzimas cabeza de serie de nuestro trabajo.

Figura IV.1. Síntesis del oleato de heptilo a 50 °C. Condiciones de reacción: [heptanol] = [ácido oleico] = 66 mM, 10 ml de isooctano, 3 mg de proteína/ml.



Podemos apreciar en la Figura IV.1 que la semipurificación hace al biocatalizador más sensible a la desactivación térmica pues las velocidades iniciales son menores con los preparados UABS y LCRS que con los de partida LCRC y UAB. Este efecto es mucho mayor en el caso de la lipasa UAB que en el caso del preparado comercial de Sigma (LCRC). Dada la diferente composición de ambas enzimas (Tabla IV.6) podemos pensar que la LIP 2 es más sensible a la desactivación térmica que la LIP 1. La velocidad inicial de la LCRC es -358 % mientras que la de la UAB es de -444 %, al pasar de 30 °C a 50 °C.

Este efecto parece acentuarse en el caso de la diálisis, donde se ve que la UABS es mucho menos activa que la UAB a 50 °C, siendo esta diferencia menor en el caso de la LCRC y LCRS.

A medida que la reacción de esterificación progresa (Figura IV.1) se produce agua, la cual parece activar a la lipasa LCRS, ya que se alcanza el mismo nivel de conversión, no ocurriendo lo mismo con la UABS. Otra vez deberemos atribuir el comportamiento a la presencia de la LIP

1 en el caso de la LCRC y de la LIP 2 en el caso de la UAB.

Tabla IV.9. Velocidades iniciales de reacción (mmol ester/mg prot.·h) en la síntesis del oleato de heptilo catalizada por LCRC y UAB a diferentes temperaturas. Condiciones de reacción: [heptanol] = [ácido oleico] = 66mM, 10 ml de isooctano y 500 rpm de agitación.

Enzimas	30 °C	50 °C
LCRC	$34 \cdot 10^{-3}$	$9,5 \cdot 10^{-3}$
UAB	$10 \cdot 10^{-3}$	$2,25 \cdot 10^{-3}$

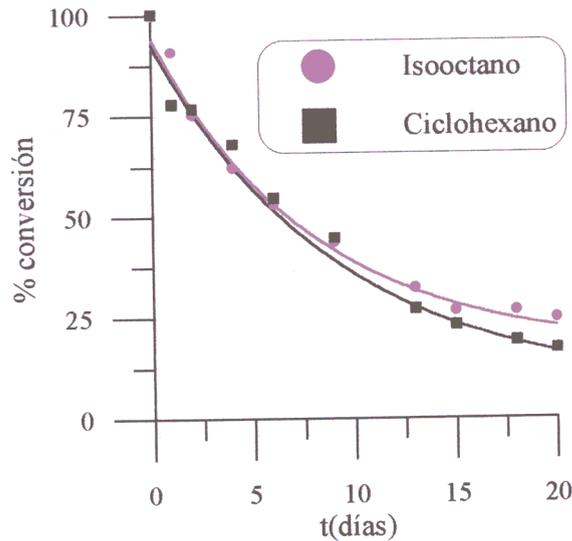
D. DESACTIVACIÓN DE LOS BIOCATALIZADORES POR DISOLVENTES ORGÁNICOS.

Este experimento se realizó para estudiar el efecto que provocaba la incubación de una enzima en el seno de un disolvente orgánico durante períodos largos de tiempo. El resultado era de gran interés para nuestro grupo ya que las preparaciones empleadas en esta Memoria se emplearon como catalizadores en medios orgánicos y muchas de las reacciones puestas a punto se siguieron durante períodos largos de tiempo donde se desconocía cual era el efecto directo que provocaba la presencia de un disolvente apolar sobre la actividad enzimática.

El estudio se centró fundamentalmente en la preparación comercial suministrada por la casa SIGMA y los disolventes de elección fueron el isooctano y el ciclohexano, debido que habían demostrado ser los mejores medios orgánicos en los que trabajaba la LCRC.²⁴⁸ Puede apreciarse que ambos disolventes hidrófobos conducen a un perfil de desactivación muy semejante.

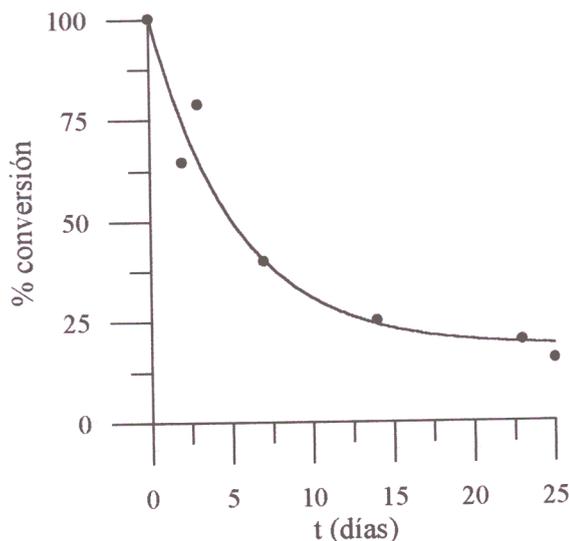
²⁴⁸ De la Casa, R.M. (1994) *Tesina de Licenciatura*. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense.

Figura IV.2. Desactivación de LCRC por isooctano y ciclohexano. Condiciones de reacción: (R,S) [2-(4-isobutilfenil) propanoico] = [n-propanol] = 66 mM, 10 ml disolvente, 30 °C, $t_r = 168h$. (Para el isooctano, el 100 % de conversión corresponde a 53 %; para el ciclohexano, el 100 % de conversión corresponde a 45 %).



Así mismo y debido al interés que exigía por nuestra parte la caracterización de las lipasas UAB, el mismo ensayo se realizó con la lipasa UAB, que fue la que más actividad lipásica (Tabla IV.5) y ester sintetasa (Tabla IV.7) y contenido en proteína tenía de todos los preparados que nos suministró el Dr. Valero. Como disolvente se eligió el isooctano, en el que la LCRC mostró tener más actividad. Los resultados se muestran en la Figura IV.3.

Figura IV.3. Desactivación de UAB por isooctano. Condiciones de reacción: (R,S) [2-(4-isobutilfenil) propanoico] = [n-propanol] = 66 mM, 10 ml de isooctano, 30 °C, $t_r = 168h$. (El 100 % de conversión corresponde a 28 %).



Estas curvas se ajustan a una ecuación de decrecimiento exponencial simple, según el caso I del modelo descrito por Henley y Sadana ²²⁹ (Ver Sección III.2.1.1.A):



donde se produce una desactivación en un sólo paso que conduce a un estado E_1 que presenta actividad catalítica baja. Esto implica transformar la ecuación general de Henley y Sadana. ⁹⁰

$$A = \alpha_2 + \left[100 + \frac{\alpha_1 \cdot k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 \cdot k_2}{k_2 - k_1}\right] \cdot e^{-k_1 t} + \left[\frac{\alpha_1 \cdot k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 \cdot k_2}{k_2 - k_1}\right] \cdot e^{-k_2 t} \quad [30]$$

en la ecuación simplificada [15]:

$$A = [100 - \alpha_1] \cdot e^{-k_1 t} + \alpha_1 \quad [32]$$

donde: $\alpha_2 = k_2 = 0$; ecuación que se ajusta a la exponencial simple [9]:

$$A = A_0 \cdot e^{-kt} + A_1 \quad [26]$$

Los parámetros obtenidos en el ajuste de la ecuación se muestran en la Tabla IV.10. Podemos apreciar que la lipasa comercial de *Candida rugosa* presenta una vida media semejante en isooctano y en ciclohexano, si bien el valor de la actividad final α_1 es mucho menor en el segundo caso. Esto se debe atribuir a un mayor efecto desnaturalizante del ciclohexano, de menor log P que el isooctano.

Por lo que se refiere a la lipasa UAB, ésta presenta el mismo perfil de desactivación que la lipasa comercial, si bien su vida media en isooctano es algo menor. Ello pudiera deberse a la distinta composición en isoformas de la lipasa UAB y LCRC (Tabla IV.6).

²²⁹ Henley, J.P. y Sadana, A. (1985) *Enzyme Microb. Technol.*, 7, 50-60.

Tabla IV.10. Desactivación enzimática a 30 °C por disolvente orgánico.

Enzima	A ₁ ^a	k ₁ (d ⁻¹)	t _{1/2}	F ^a	% α ₁ ^b
LCRC ⁽¹⁾	77	0,12	6,6	1	16
LCRC ⁽²⁾	86	0,1	6,8	1	63
UAB ⁽¹⁾	82	0,18	5	0,75	18

⁽¹⁾ Datos referidos a la desactivación por isooctano.

⁽²⁾ Datos referidos a la desactivación por ciclohexano.

^a Factor de estabilización.

^b Porcentaje de actividad específica del estado E₁ con respecto a la actividad específica inicial.

E. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE MODIFICACIÓN DE LA ENZIMA.

La determinación del grado de modificación se realizó a partir de la determinación del contenido de azúcares de las muestras utilizando el método de la antrona de Clegg,²³⁶ descrito en la Sección III.2.2.1.B de la *Parte experimental*. Esta técnica se empleó para los derivados que habían sido modificados por unión no covalente (LCRm y UABm) y para los modificados covalentemente (LCRM y UABM) con los dextranos.

En las Tablas IV.11 y IV.12 se muestran los resultados obtenidos al modificar por unión no covalente las preparaciones LCRS y UABS, que dieron como consecuencia los derivados nombrados como LCRm y UABm. El porcentaje teórico se realizó a partir de la relación enzima semipurificada/dextrano (p/p) diseñada para cada experimento.

El porcentaje experimental se refiere al obtenido por el método de la antrona a partir de la curva de calibrado [31] obtenida de los datos de la Tabla III.3. En todos los casos estudiados la presencia de dextrano detectada coincide, teniendo en cuenta el error experimental, con la

²³⁶ Clegg, K.M. (1956) *J. Sci. Food Agric.*, 7, 40.

esperada teóricamente. Ello se debe a que se realizó la adición directa del azúcar sobre la preparación semipurificada y después se liofilizó la muestra (Sección III.2.2.1).

Tabla IV.11. Grado de unión de los dextranos de diferente peso molecular a la LCRS en los derivados modificados no covalentemente.

Dextranos (KDa)	Relación	% Teórico	% Experimental
6	40/10	20	23,6
	40/20	33,3	29,9
	40/30	42,85	34,4
12	40/10	20	19,4
	40/20	33,3	32,5
	40/30	42,85	41,2
25	40/5	11,1	11,9
	40/10	20	24,9
	40/20	33,3	30,0
50	40/5	11,1	12,8
	40/10	20	14,1
	40/15	27,3	27,4

La misma conclusión obtenemos al estudiar los datos referidos al cálculo de dextrano presente en la preparación UABm, donde sólo se ensayó la relación enzima/dextrano 40/10 con dextranos de diferente peso molecular, por lo que el cálculo teórico en todos los casos fue de un 20 % de dextrano. Se observa que independientemente del peso molecular del dextrano, el azúcar presente sólo es función de la cantidad añadida en peso sobre la preparación semipurificada.

Tabla IV.12. Grado de unión de dextranos de diferente peso molecular a UABS en los derivados modificados no covalentemente.

Dextranos (KDa)	Relación	% Teórico	% Experimental
6	40/10	20	24
12	40/10	20	20
25	40/10	20	22
50	40/10	20	22

En el caso de los derivados obtenidos por modificación covalente, los resultados se muestran en la Tabla IV.13 donde podemos observar que la preparación UABM presenta mayor grado de modificación que la LCRM tras haber sido sometida a la misma metodología y en las mismas condiciones experimentales (Sección III.2.2.3).

Tabla IV.13. Porcentaje de azúcares en LCRM y UABM. Las preparaciones modificadas covalentemente proceden de 100 mg de derivado semipurificado (LCRS y UABS) modificado en presencia de 25 ml de dextranos de peso molecular de 6 KDa de concentración 25 mg/ml.

Derivado	% azúcares
LCRM	6,31
UABM	9,21

Esta diferencia en cuanto al grado de modificación debe atribuirse a la diferente composición de isoformas y por tanto, diferente relación de lisinas en ambas enzimas. Así mismo indicar que el porcentaje de azúcares unido covalentemente es inferior al que se obtiene por modificación no covalente.

F. DESACTIVACIÓN TÉRMICA EN MEDIO ORGÁNICO DE LOS DISTINTOS CATALIZADORES.

Para conocer la estabilidad térmica se estableció una temperatura de almacenamiento de 50 °C, empleando las diferentes preparaciones enzimáticas utilizadas a lo largo de esta Memoria (Figura IV.4).

La desactivación térmica de todas las enzimas se ajustaron dentro del error experimental, a una desactivación simple donde $\alpha_2 = k_2 = 0$. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla IV.14.

Puede observarse que la semipurificación por diálisis produce un derivado que una vez liofilizado, es menos estable que la lipasa de partida, ya que k aumenta y la vida media disminuye.

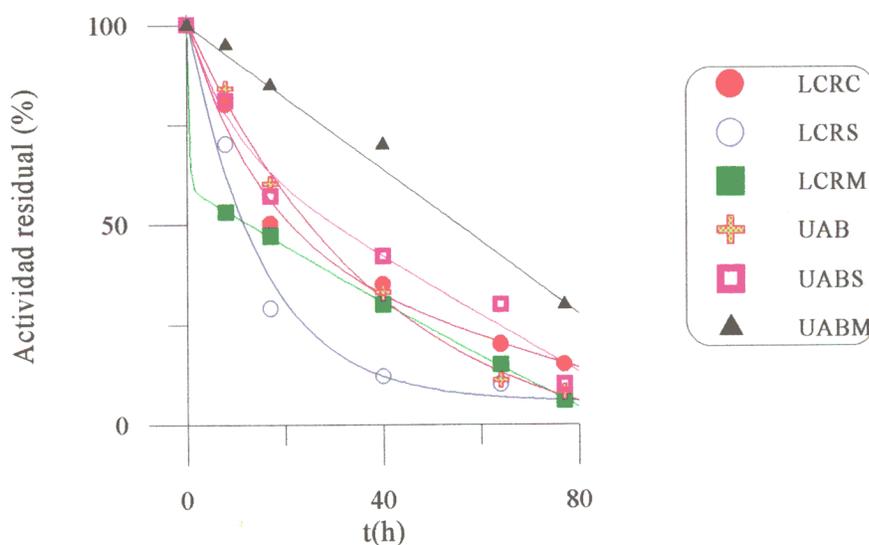
Por lo que se refiere a la modificación química covalente, produce un efecto estabilizador en ambos casos, disminuyendo la constante de desactivación respecto a la enzima de partida (LCRS y UABS).

Tabla IV.14. Desactivación térmica a 50 °C en isoocetano.

Enzima	A_1^a	k_1 (h ⁻¹)	α_1 (%)
LCRC	90,7	$3,8 \cdot 10^{-2}$	10,35
LCRS	92,4	$6,7 \cdot 10^{-2}$	6,0
LCRM	87,2	$5,6 \cdot 10^{-2}$	10,6
UAB	94,6	$2,7 \cdot 10^{-2}$	5,7
UABS	90,8	$3 \cdot 10^{-5}$	9,3
UABM	94,8	$2 \cdot 10^{-5}$	5,2

^a Porcentaje de actividad del estado intermedio E_1 con respecto a la actividad inicial.

Figura IV.4. Perfil de desactivación a 50 °C en isoocetano.



Respecto a las preparaciones puras, LCRA (LIP 3) y LCRB (LIP 1), presentan diferente estabilidad térmica según el medio, según se muestra en la Tabla IV.15:

Tabla IV.15. Estabilidad térmica en agua y en isooctano a 50 °C de LCRA (LIP 3) y LCRB (LIP 1).¹⁸⁵

	H ₂ O (50 °C)		Isooctano (50 °C)	
	k _d (h ⁻¹)	t ½ (h)	k _d (h ⁻¹)	t ½ (h)
LCRA	0,38	0,28	3	0,25
LCRB	2,8	0,23	0,7	0,9

Puede apreciarse que en medio acuoso, la LCRA (LIP 3) es algo más estable que la LCRB (LIP 1) mientras que ocurre lo contrario en isooctano como cabía esperar. Esto puede explicar la mayor actividad catalítica observada para la LCRB en reacciones en medios orgánicos apolares inmiscibles en agua como el isooctano.¹⁸⁵ Este resultado explica por qué la LCRC es más estable que la UAB en medios orgánicos (Tabla IV.14).

La menor estabilidad térmica de las lipasas puras puede deberse a la eliminación de las moléculas de bajo peso molecular, tal como la lactosa que tiene la LCRC, que parecen estabilizar la enzima frente a la desactivación térmica.

¹⁸⁵ Hernáiz, M.J., *Tesis Doctoral* (1996) Universidad Complutense de Madrid.

2. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRATACIÓN.

2.1. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DEL AGUA.

1. RMN-¹H del agua en disolventes orgánicos.

El estudio del agua en los disolventes con diferente log P utilizados en la Memoria se abordó comparando las señales RMN-¹H de los citados disolventes cuando se analizaron las muestras en ausencia y presencia de agua.

De todos ellos fue en la isobutil metil cetona donde se observó una mejor identificación de la señal del agua dentro de las condiciones de preparación de la muestra previamente optimizadas, debido fundamentalmente a que con los disolventes muy hidrofóbicos (isooctano o ciclohexano) la adición de agua provocaba la aparición de un sistema bifásico. Por ello, al tomar la muestra de la fase orgánica la señal del agua era apenas detectable. Sin embargo, con la isobutil metil cetona, dadas las características de hidrofilia del disolvente, su log P y la solubilidad del agua en este disolvente, fue posible identificar la señal RMN-¹H del agua a un desplazamiento químico $\delta=3,66$ ppm tal y como se muestra en las Figuras IV.5 y IV.6.

Figura IV.5. Espectro de RMN-¹H de la isobutil metil cetona anhidra.

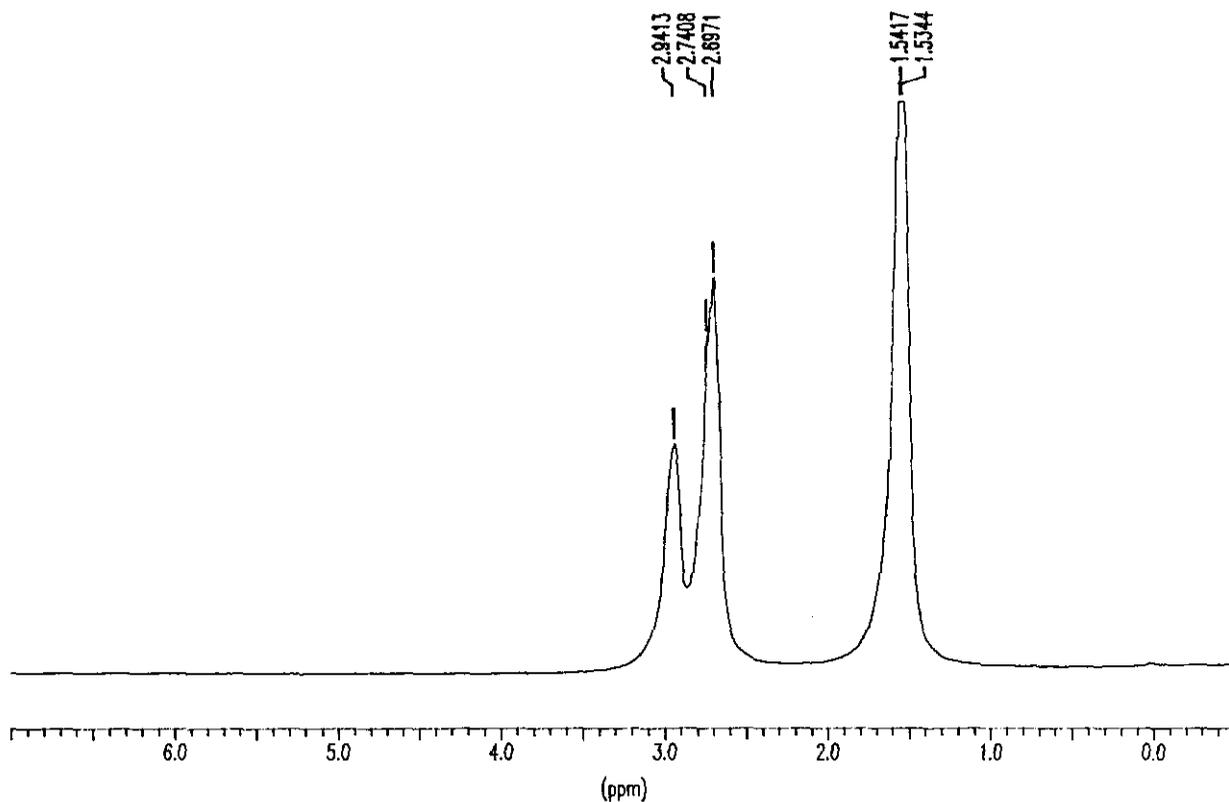
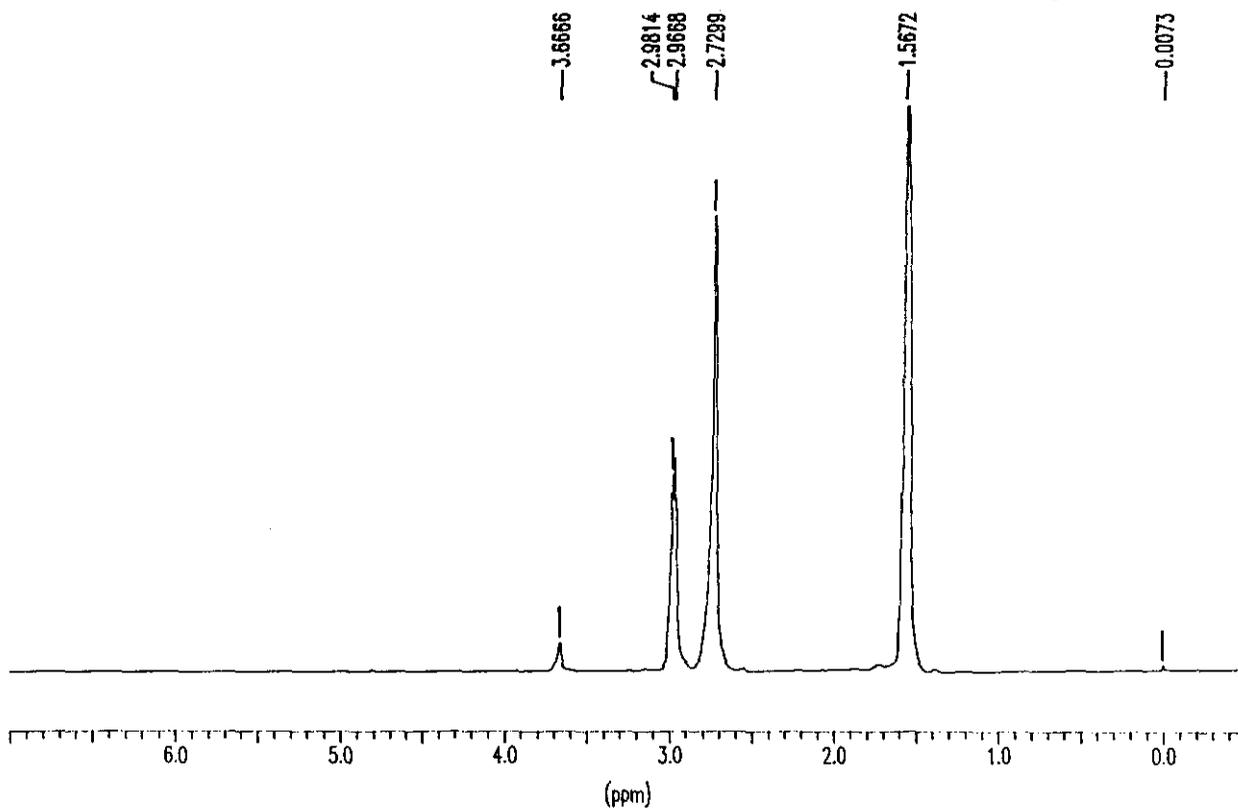


Figura IV.6. Espectro de RMN-¹H de la isobutil metil cetona saturada con agua.



Esta señal nos permitiría cuantificar la cantidad de agua que se une a la proteína. La intensidad del pico debería ser proporcional a la cantidad de agua que satura a la isobutil metil cetona y que es mayor que el valor de 150 μl agua/ml de disolvente,²⁴⁸ obtenida a partir de la isoterma de absorción de agua de la isobutil metil cetona pura, para un valor de $a_w \leq 1,0$.

2. RMN ^1H del agua en un sistema bifásico.

Con el fin de llevar a cabo un estudio de lo que ocurría cuando se añadía agua a una reacción enzimática catalizada en medio orgánico se diseñó una muestra prototipo sobre la que se analizó la señal RMN ^1H del agua presente en la fase acuosa, donde estaba la enzima y en la fase orgánica, formada fundamentalmente por el disolvente orgánico. De esta manera se analizó la redistribución que sufre el agua entre un disolvente orgánico de características relativamente hidrófilas y entre el biocatalizador enzimático, caracterizado por la existencia de la capa de agua que mantiene su conformación catalíticamente activa.

a) Estudio de RMN ^1H del agua presente en la fase orgánica.

La identificación de la señal RMN ^1H del agua con la correspondiente localización del desplazamiento químico ($\delta=3,66$) realizada en el experimento anterior indicó la presencia de agua en esta fase. La cuantificación del agua presente en la fase orgánica fue posible gracias a la presencia de la referencia interna utilizada que consistió en TMS al 10 % en cloroformo tal y como se indicó en la *Parte experimental*. En la Tabla IV.16 se indican las señales correspondientes al análisis RMN ^1H del agua de esta fase.

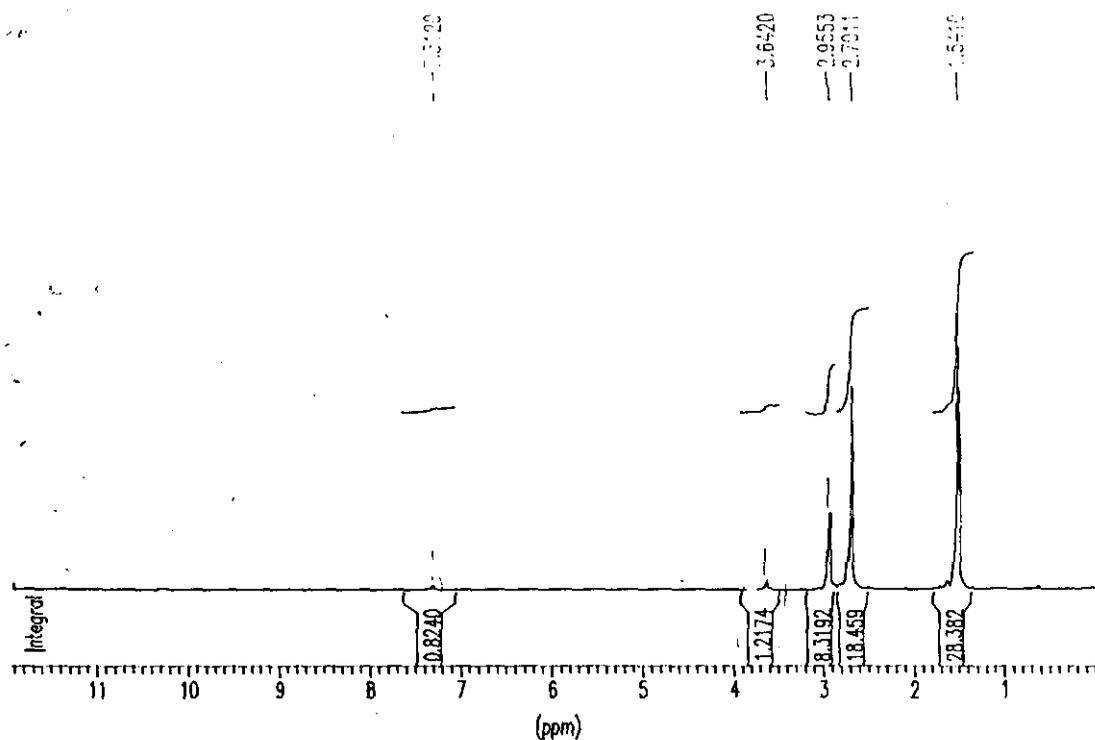
²⁴⁸ Casa, R.M. (1994) *Tesina de Licenciatura*. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense.

Tabla IV.16. RMN ^1H del agua de la fase orgánica del sistema bifásico.

Muestra	δ (ppm)	Integral
Referencia	7,27	0,8240
-CH ₂ -	2,955	8,3192
Agua	3,642	1.2174

A partir de estos datos vemos que la relación entre la intensidad de la señal RMN ^1H del agua ($\delta=3,64$) y la señal RMN ^1H del cloroformo ($\delta=7,2$) presente como referencia interna es (1,5).

Figura IV.7. Espectro de RMN ^1H del agua de la fase orgánica de un sistema bifásico. Disolvente: isobutil metil cetona.



La cuantificación de esta señal -concentración molar de agua- se realizó en base a un cálculo que relaciona las integrales de las señales. Como se ha comentado en la *Parte*

experimental, la muestra diseñada para este ensayo estaba formada por 8 ml de isobutil metil cetona y 1 ml de agua por lo que la concentración del disolvente era de 7,1 M. Teniendo en cuenta que la isobutil metil cetona tiene un grupo metileno (-CH₂-), cuya señal de RMN ¹H da un doblete; este doblete corresponderá a la misma concentración de grupos metileno (7,1 M), y la integral de la señal corresponderá a una concentración 14 M de protones. De esta manera, a partir de la señal correspondiente al grupo metileno, que aparece con un desplazamiento químico (δ) de 2.955 ppm y con una integral de valor 8,319, se puede calcular la concentración a la que corresponde la integral de la señal RMN ¹H del agua, cuyo valor es 1,217 y que aparece a 3,64 ppm, tal y como se muestra en la Tabla (IV.15). Realizando estos cálculos tenemos que el agua estaría a una concentración de 1,07 M. Esta cantidad está muy por encima de la necesaria para la saturación del disolvente, calculada en 8,33 μmoles.²⁴⁸ Así pues tenemos que el agua estaría microdispersa en el medio orgánico.

b) Estudio del agua presente en la fase acuosa.

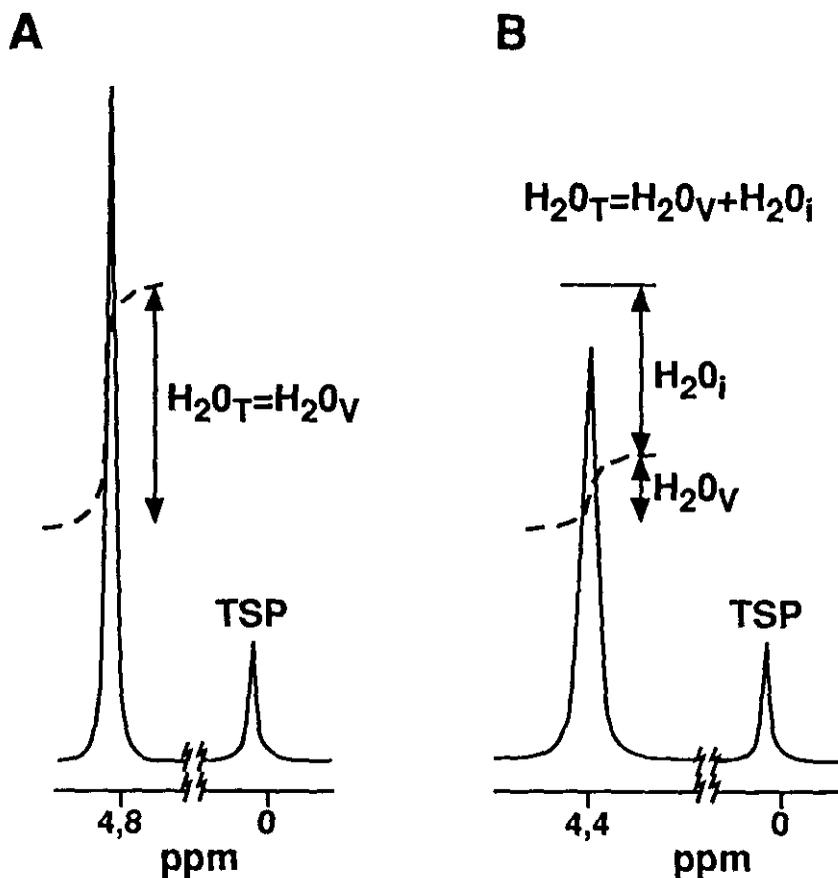
Seguidamente se realizó el espectro RMN-¹H de la fase acuosa, donde se encontraba a enzima, para cuantificar el agua unida a la enzima.

En la Figura IV.8 se muestra un esquema cualitativo a fin de explicar la metodología seguida para la cuantificación del agua invisible . Este agua invisible es el agua que durante el proceso de registro del espectro cambia de magnetización tan rápidamente que no puede ser detectada por la técnica. Así en un espectro de agua pura (Figura IV.8A), la integral del agua pura respecto a la referencia TSP, TMS o CHCl₃ posee un valor determinado; siendo el agua total igual

²⁴⁸ Casa, R.M. (1994) *Tesina de Licenciatura*. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense.

al agua visible ($H_2O_T = H_2O_V$). Cuando se encuentra en su seno una proteína, la señal de la figura disminuye respecto a la señal de la referencia. Por ello, tenemos que $H_2O_T > H_2O_V$, definiéndose el agua invisible como la diferencia ($H_2O_i = H_2O_T - H_2O_V$), en presencia de la proteína.

Figura IV.8. Determinación del agua visible y agua invisible en RMN- 1H . **A:** Espectro RMN- 1H del agua en ausencia de la proteína. **B:** Espectro de RMN- 1H en presencia de la proteína. El TSP no se representa en la misma escala que la resonancia del agua.



Si en el caso anterior se dedujo que si la relación de intensidades de las señales agua/referencia empleando RMN- 1H correspondía a un valor de 1,07 M de agua en el medio orgánico, la relación de intensidades (Tabla IV.17) en este caso entre el agua y la referencia (14140/241) tiene un valor de 58,67, que corresponde a una concentración 38 M de agua en la fase acuosa del sistema empleado.

Como la concentración del agua pura es 55,5 M, tenemos que de la concentración presente

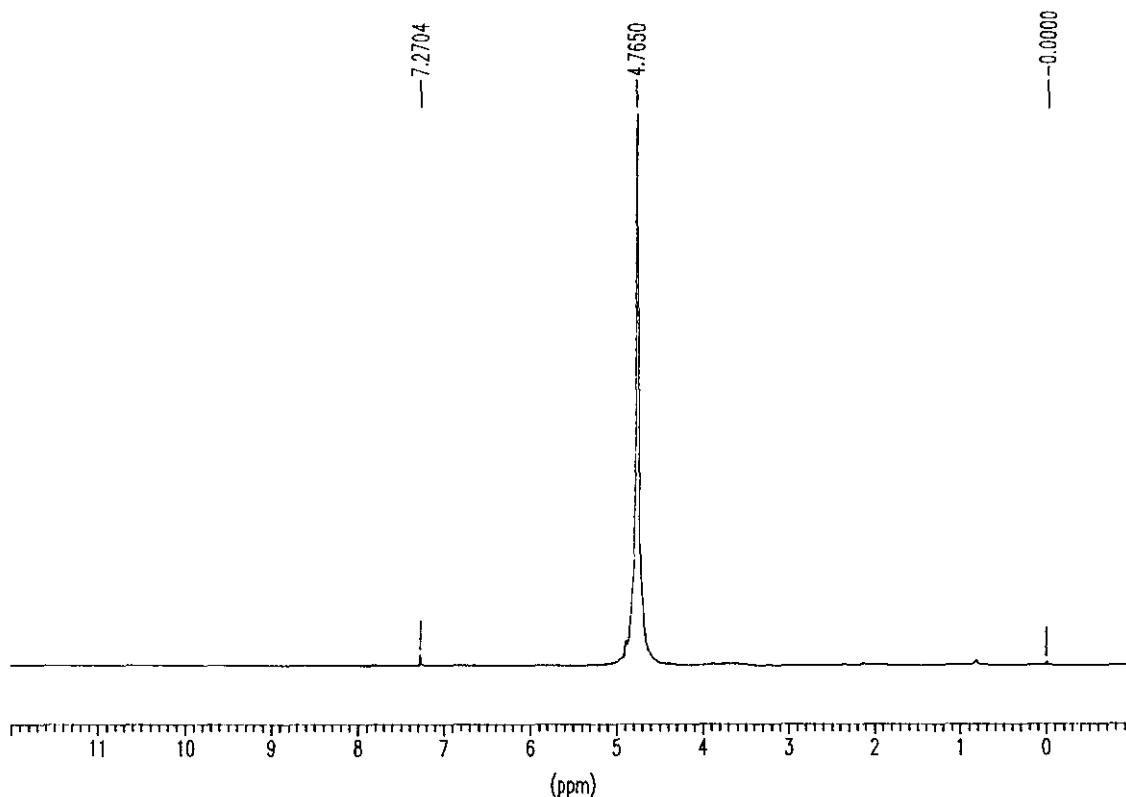
de agua, el 69 % está como agua visible en la fase acuosa y el 31 % como agua invisible.

Tabla IV.17. RMN ^1H del agua presente en una fase acuosa (Figura IV.9).

Señal	δ (ppm)	Intensidad
Referencia	7,27	241
Agua	4,76	14140

En este caso el espectro obtenido se muestra en la Figura IV.9.

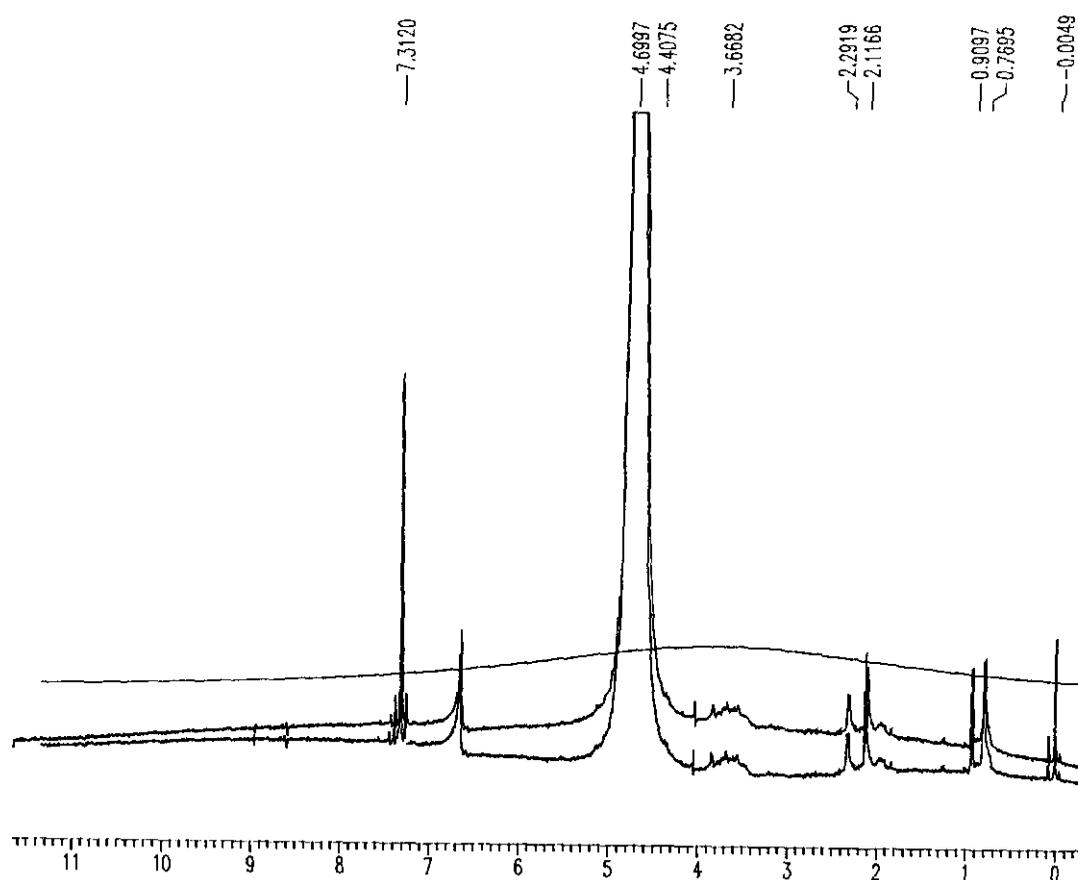
Figura IV.9. Espectro RMN- ^1H del agua de la fase acuosa.



Estos resultados, aunque imprecisos, indicaban que dentro de la fase acuosa había que discernir entre el agua libre presente como disolvente y el agua ligada a la proteína, que sería invisible al RMN- ^1H al transferir su magnetización a los protones de la proteína. Este hecho quedó evidenciado cuando se procedió a una depuración más exhaustiva del espectro (Figura

IV.10) donde se observó una señal aguda que correspondería al agua libre y una señal muy ancha que correspondería al agua que estaba ligada a la proteína. Este ensanchamiento corresponde a una disminución del tiempo de relajación T_1 (espín-red) de los ^1H del agua unida a la proteína por disminución de su movilidad, así como a una disminución del tiempo de relajación T_2 (espín-espín). Ambos efectos provocarían un ensanchamiento de la banda tal y como se concretó en la Sección I.5.1.

Figura IV.10. Visualización de los dos tipos de agua a partir del espectro RMN ^1H del agua presente en una fase acuosa.



Para cuantificar estos dos tipos de agua se hizo uso, como en los casos anteriores de las relaciones de las señales de los dos tipos de agua con la señal que correspondía a la referencia

interna. En este caso, los resultados nos llevaron a un 71 % de agua libre y un 29 % de agua invisible al RMN, muy similar al determinado previamente en el ajuste más grosero.

Por otro lado si comparamos el valor del desplazamiento químico de la señal del agua libre ($\delta = 4,6997$ ppm) (Figura IV.10) con la de la señal del agua libre en el caso del agua pura ($\delta = 4,7650$ ppm) (Figura IV.9), vemos que hay un desplazamiento a campos más altos, en el caso de estar presente la proteína, de $\Delta\delta = 0,0653$ ppm. Esto nos indica la existencia de dos tipos de intercambio de moléculas de agua con la proteína. Uno lento detectado por la banda ancha y otro rápido, que se ve por este desplazamiento del agua libre. Este efecto se debe a que al trabajar a altas temperaturas lo que vemos es una señal promedio de los dos tipos de agua, el agua verdaderamente libre y el agua de intercambio rápido con la proteína. Estas señales sólo serían visibles a temperaturas próximas al cero absoluto.

Para completar este estudio se realizó un experimento de transferencia de magnetización sobre la fase acuosa del sistema bifásico diseñado. La transferencia de magnetización consiste en irradiar la señal de RMN- ^1H del agua a diferentes frecuencias observando la variación de la intensidad de la señal al haber dos tipos de agua; uno unido a la proteína (banda ancha) y uno de agua libre (banda aguda). Si bien representan en realidad el promedio del agua realmente libre y la que presenta el intercambio rápido, ya que serían a diferente δ que el agua pura. Si irradiamos a frecuencias variables, la señal de magnetización sería diferente de la del agua pura, y la relación $A_{\text{obt}}/A_{\text{max}} < 1$, hasta que abandonemos la zona de la banda ancha, en cuyo caso $A_{\text{obt}}/A_{\text{max}} = 1$.

Los valores de los cocientes de las áreas que cuantifican la intensidad de las señales obtenidas fueron posteriormente normalizadas a uno. De esta manera, se estudió el

comportamiento del agua presente en esta fase acuosa cuando la muestra era irradiada a diferentes frecuencias y el resultado se comparó con el obtenido cuando la experiencia se realizaba con una muestra de agua pura. Los resultados se muestran en la Figura IV.11 y se observa un diferente comportamiento en la transferencia de magnetización entre el agua pura y el agua con la LCRC. Esto nos indica que en presencia de la lipasa hay un agua "invisible" que provoca que la transferencia de magnetización en este caso sea diferente a cuando el agua está en estado puro. El ancho de dicha banda es de -10^4 a $+10^4$ Hz, o sea $2 \cdot 10^4$ Hz. Esto implica unos microentornos muy diferentes de transferencia de magnetización de los ^1H que interaccionan con la proteína.

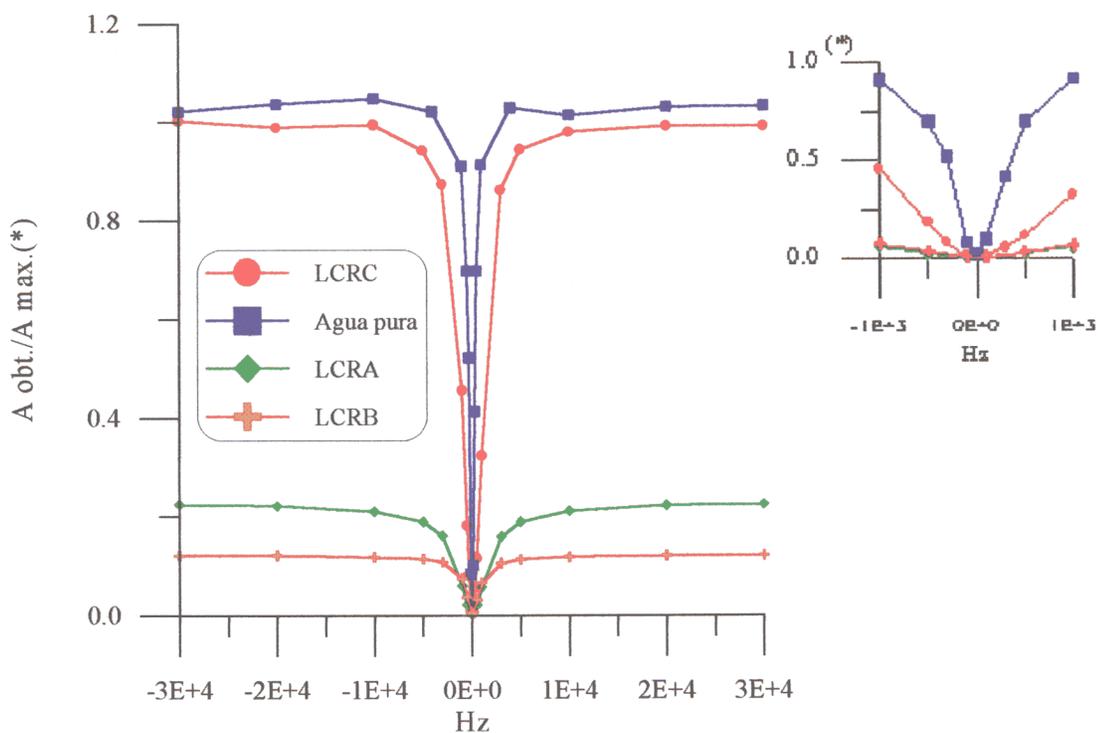
En la Figura IV.11 también se presentan los resultados obtenidos al estudiar la transferencia de magnetización del agua cuando está en presencia de las isoenzimas puras (LCRA y LCRB). El perfil de las muestras conteniendo las proteínas difiere aún más que la preparación comercial respecto al agua pura. Podemos apreciar que el ancho de la banda asociada al agua unida a la proteína es $< 6 \cdot 10^4$ Hz. Esto indica que estas isoformas tienen un mayor contenido de agua "invisible" que la preparación comercial pues al observar el comportamiento en un rango de frecuencias más estrecho, vemos que la anchura de la transferencia correspondiente a las isoformas es más ancha ($A_{\text{obt}}/A_{\text{max}}$ menor) que la de la preparación comercial y ésta menor de la que corresponde al agua pura.

Si medimos la altura máxima del perfil que alcanza la representación del experimento de transferencia de magnetización correspondiente a cada una de las muestras, tenemos que si al agua se le asigna el valor de 100 %, el que corresponde a la LCRC en solución acuosa la altura de su perfil corresponde a un 95 % de agua libre; y además implica que por diferencia, hay aproximadamente un 5 % de agua fuertemente unida.

Para el caso de LCRA, la altura del perfil de la representación corresponde a un 21 % de agua libre, por lo que tiene un 78 % de agua unida. Mientras que para el caso de LCRB, le corresponde un 12 % de agua en solución y 88 % de unida. Esto indica que la LCRA tiene más agua unida fuertemente que la LCRB, lo que indica su mayor hidrofilia, hecho que quedará confirmado posteriormente con los análisis realizados por otro tipo de técnicas.

Por tanto, cuando la transferencia de magnetización es mayor indica que hay una mayor cantidad de agua invisible, que altera el proceso de transferencia provocando que el comportamiento de la señal sea diferente del que corresponde al agua pura.

Figura IV.11. Ensayo de transferencia de magnetización para el agua presente en muestras de LCRC, LCRA y LCRB en solución acuosa comparadas con el ensayo en agua pura.



Una posible explicación sería que al tener la muestra comercial, LCRC, muchas impurezas hidrófilas, esta preparación retiene o invisibiliza poca agua. Por el contrario, las lipasas

puras, que carecen de impurezas hidrófilas, deben invisibilizar más agua al ser más accesible.

De las diferencias observadas en las dos isoformas cuya homología es del 80 %, deducimos que la LCRA debe tener mayor número de cavidades hidrofóbicas en su estructura donde el agua unida intercambiaría lentamente con el agua externa.

Por otro lado y continuando con el estudio del comportamiento del agua en un medio bifásico, se procedió al cálculo de los tiempos de relajación del ^1H del agua presente en cada una de las dos fases, cuyo resultado se muestra en la Tabla IV.18. Los tiempos de relajación T_1 y T_2 se determinaron empleando las secuencias de inversión, recuperación y de Carr-Purcell-Meiboom-Gil, respectivamente.

Tabla IV.18. Tiempos de relajación de los ^1H del agua calculados en para las fases estudiadas.

Muestra	T_1 (seg)	T_2 (mseg)
Fase acuosa	1,83	46,58
Fase orgánica	5,48	93,51

Los tiempos de relajación, T_1 y T_2 , correspondientes a la fase acuosa son más pequeños que los correspondientes al agua en la fase orgánica. Esto es debido a que en la fase orgánica la presencia de agua es muy inferior comparada con la presente en la fase acuosa. En consecuencia, la recuperación magnética al estado inicial de un ^1H del agua en la fase orgánica está más impedida ante la dificultad de optar por una relajación espín-espín con el espín nuclear de un ^1H de una molécula de agua vecina.

3. Cuantificación del agua unida a las isoformas puras mediante la técnica de RMN

¹H.

El análisis de la presencia de agua en las isoformas puras, LCRA y LCRB, se realizó también a partir del estudio de los espectros de RMN ¹H del agua de las correspondientes muestras junto con otra muestra de agua pura de cantidad conocida ver Figuras IV.13, IV.14 y IV.15). La cuantificación del agua presente se llevó a cabo en relación a la referencia presente en las muestras. Los resultados se muestran en la Tabla IV.19 donde se indica la relación de la señal del agua con respecto a la referencia para cada una de la muestras analizadas.

Tabla IV.19. Análisis de los espectros de RMN ¹H del agua en las isoformas puras (Figuras IV.13, IV.14 y IV.15).

Muestra	Señal agua/señal referencia	Agua libre (moles)	Agua invisible (moles)	moles de agua/proteína
Patrón de agua	346	$2,77 \cdot 10^{-3}$	-	-
Agua-LCRA	282	$2,26 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$6,4 \cdot 10^3$
Agua-LCRB	282	$2,26 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$6,2 \cdot 10^3$

La relación entre la señal del agua y la de la referencia es la misma en las dos isoformas; sin embargo teniendo en cuenta el peso molecular de las mismas (64 KDa para LCRA y 62 KDa para LCRB) se detecta una mayor presencia de agua unida a LCRA que a LCRB, aunque la diferencia no es muy notable.

Si suponemos que la molécula de agua es una esfera de 0,9 Å de radio y las isoenzimas, una esfera de 69 Å de diámetro,²⁴⁹ podemos determinar el grado de recubrimiento de la proteína.

²⁴⁹ Protein Data Bank.

El número de moléculas de agua que recubren la esfera de la proteína, se determinó a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{\pi(69/2)^2}{\pi(0,9)^2 \cdot n} = 1, \text{ siendo } n = 1469 \text{ moléculas de agua/molécula de proteína.}$$

Como el número de moléculas de agua invisible es: para LCRA = $6,4 \cdot 10^3$ y para LCRB = $6,2 \cdot 10^3$, tenemos que el número de capas de agua que intercambian con la proteína son respectivamente:

$$\text{LCRA} = \frac{6,4 \cdot 10^3}{1469} = 4,3$$

$$\text{LCRB} = \frac{6,2 \cdot 10^3}{1469} = 4,2$$

Así pues hay un equivalente a 4 capas de moléculas de agua que intercambian su magnetización con los hidrógenos de la proteína durante el tiempo de adquisición del espectro de RMN.

Este resultado parece contradecir la afirmación tradicional admitida de que la isoenzima A es más hidrófoba que la isoenzima B, ya que en el proceso de purificación aquella se eluye con etilénglicol.¹⁸⁹ Esta afirmación fue reconfirmada por Otero y col.¹⁶⁸ al estudiar el comportamiento de ambas isoenzimas en presencia de AOT empleando la técnica de fluorescencia. No obstante,

¹⁸⁹ Rúa, M.; Díaz-Mouriño, T.; Fernández, V.M.; Otero, C. y Ballesteros, A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1156**, 181-189.

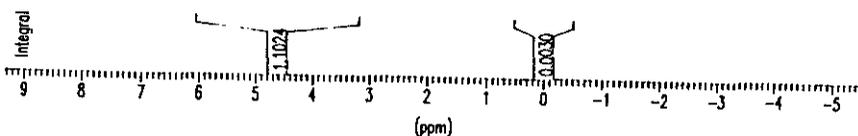
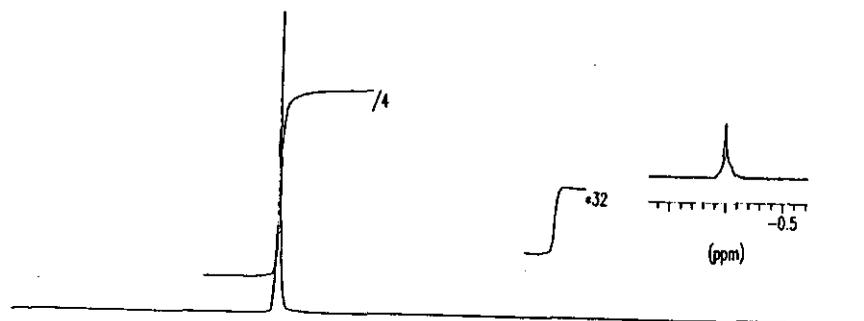
¹⁶⁸ Otero, C.; Rúa, M.L. y Robledo, L. (1995) *FEBS Letters*, **360**, 202-206.

ya estos autores reconocen la menor estabilidad de la lipasa B en medios tensoactivos, lo cual fue corroborado por Calvo y col.¹⁶⁹ un año después empleando diversos tensoactivos. Así pues creemos que tanto el modelo de las micelas reversas como el basado en la purificación no resultan óptimos para estudiar la hidrofobicidad de ambas isoenzimas dada la rápida desnaturalización del la LCRB. Como dato a este respecto apuntaremos que la LCRA posee un mayor contenido en azúcar (8 %) y la LCRB (3,6 %), lo cual se opone a la hidrofilia considerada de las isoenzimas.

Nuestros experimentos, al hacerse en ausencia de tensoactivos, sí que nos permiten medir la verdadera hidrofilia de las enzimas y por ello los valores relativos coinciden con el contenido en azúcares de las isoformas, donde se unirán el mayor número de moléculas de agua.

Por ello la LCRA, invisibiliza más agua que la LCRB, a pesar de tener una proporción de agua fuertemente unida.

Figura IV.12. RMN ¹H del agua de una muestra formada por 50 µl agua y 20 µl de TMS/agua (20 mg/ml).



¹⁶⁹ Calvo, M.V.; Plou, F.J. y Ballesteros, A. (1996) *Biocatal. & Biotransformations*, **13**, 271-285.

Figura IV.13. RMN ¹H del agua de una muestra formada por 50 μl agua, 5 mg de LCRA y 20 μl de TMS/agua (20 mg/ml).

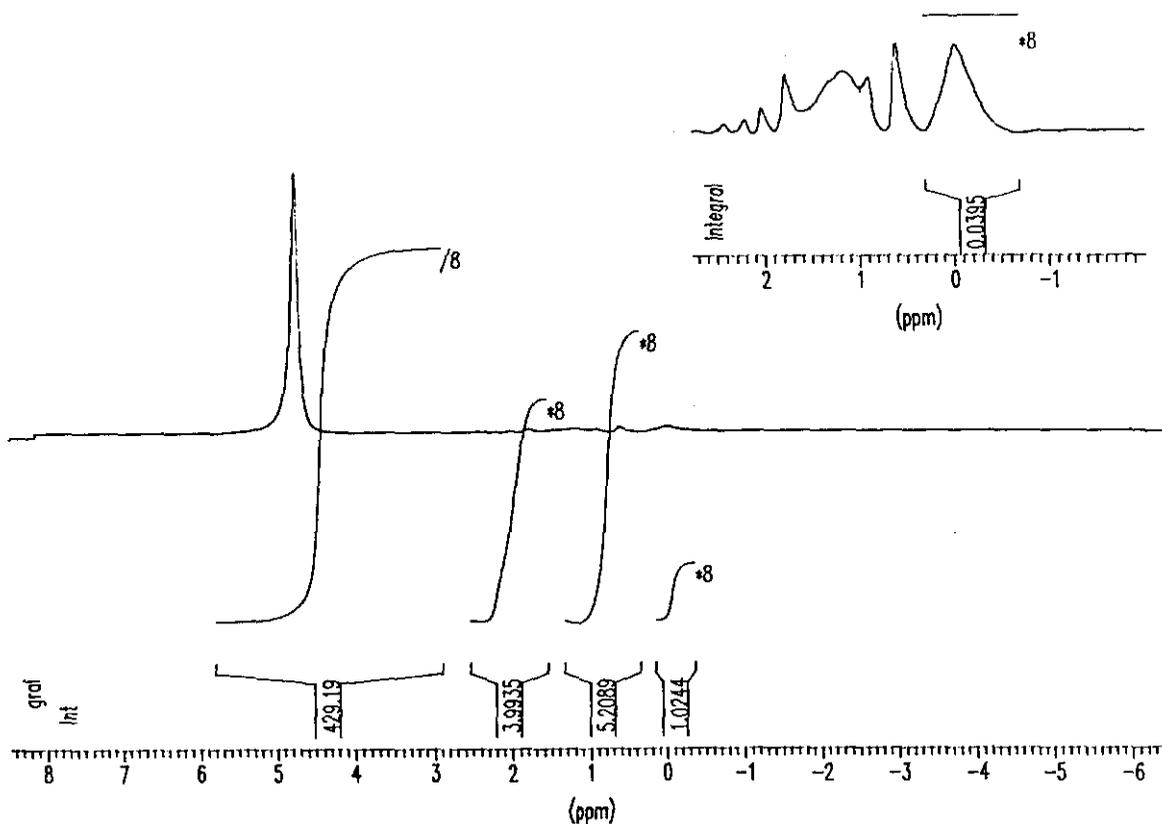
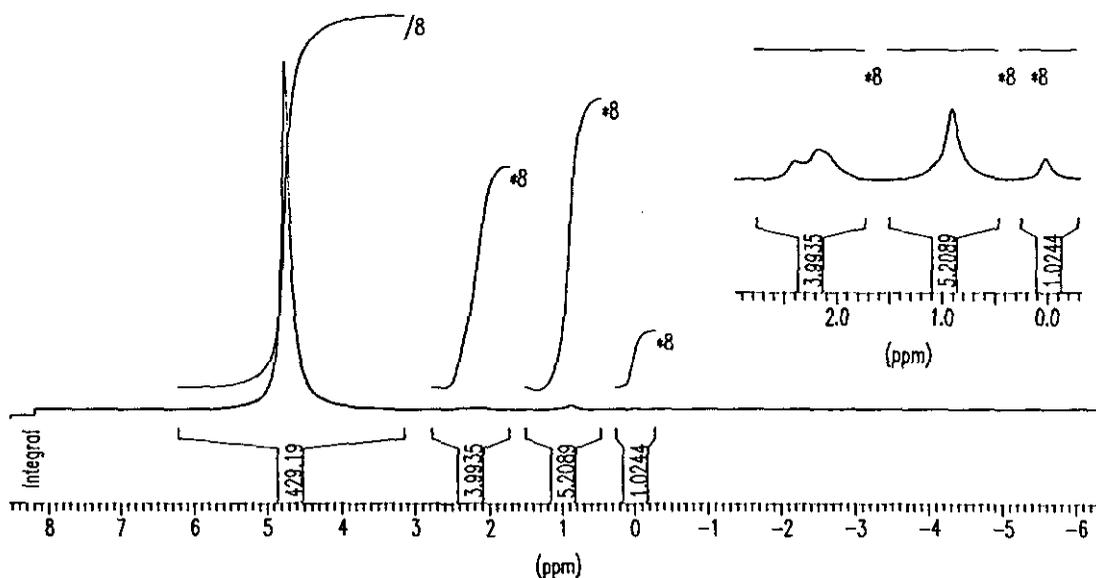


Figura IV.14. RMN ¹H del agua de una muestra formada por 50 μl agua, 5 mg de LCRB y 20 μl de TMS/agua (20 mg/ml).



2.2. ANÁLISIS TÉRMICO DIFERENCIAL (ATD) Y ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (ATG).

El otro problema que nos propusimos abordar fue determinar el grado de hidratación de los diferentes preparados enzimáticos sólidos obtenidos de la liofilización. Como se indicó en la *Introducción* (Sección 1.1), la estructura de la proteína liofilizada se ve afectada por el medio a partir del cual se obtuvo y/o de su grado de pureza.

Se hizo uso de la técnica de termoanálisis, cuyos principios y bases fueron comentadas en la *Introducción* de esta Memoria. Se emplearon para este ensayo la preparación comercial suministrada por Sigma (LCRC), la correspondiente preparación semipurificada (LCRS), la lipasa UAB y las isoformas puras (LCRA y LCRB).

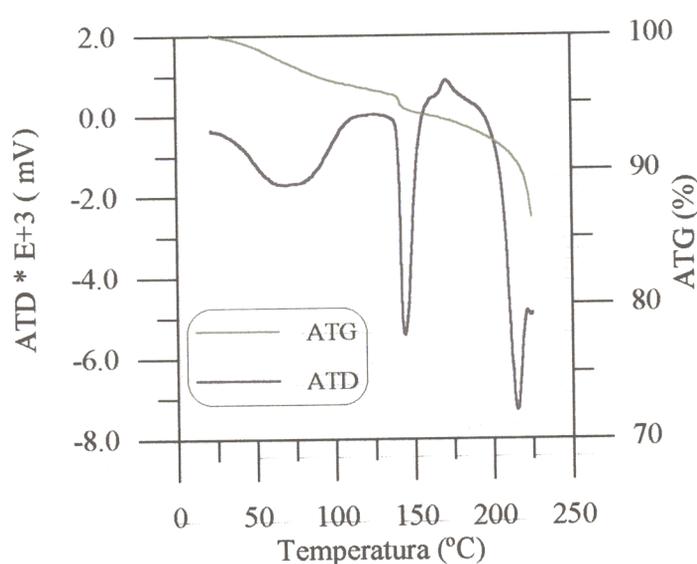
1. Lipasa comercial de *Candida rugosa*.

El análisis termogravimétrico de la LCRC se muestra en la Figura IV.15. De la observación de dicha gráfica se comprueba que en principio hay una pérdida de peso de 4,5 % en el intervalo de temperatura desde 23 °C a 135 °C, y que está asociado a un considerable efecto endotérmico que aparece con un máximo ancho centrado a 71 °C. A continuación aparece una pérdida parcial de peso que corresponde a 1,3 % asignada a la deshidratación de la lactosa monohidratada presente en la preparación comercial.²⁵⁰ Este proceso causa un importante efecto endotérmico que aparece en un intervalo de temperatura comprendido entre 135 °C y 159 °C con un pico a 144 °C. La descomposición de la lactosa presente en la preparación comercial provoca

²⁵⁰ De la Casa, R.M.; Sánchez-Montero, J.M.; Rojas, R. y Sinisterra, J.V. (1998) *Biotechnol. Technol.*, **12** (11), 823-827.

la aparición de un último efecto endotérmico cuando la temperatura supera los 200 °C.¹¹⁵ El pequeño pico exotérmico fue asociado por Gentili y col.¹¹⁵ a la disolución de la lactosa en el medio. Estos resultados indican que el preparado comercial contiene una gran cantidad de lactosa monohidratada que se añadiría como aditivo estabilizante y cuya presencia es importante en la actividad de la enzima, estimada en un 30 % en peso del total.¹⁸⁹

Figura IV.15. Curvas de ATG y ATD para LCRC.



2. Lactosa monohidratada.

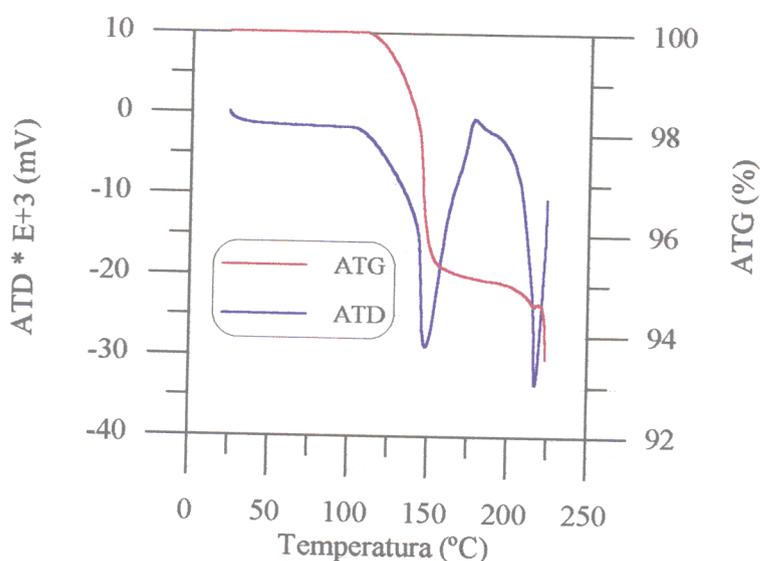
Se realizaron los análisis ATD y ATG correspondientes a la lactosa pura monohidratada. De los resultados que se muestran en la Figura IV.16, se deduce que está presente en la preparación comercial de LCRC como una entidad molecular diferenciada, ya que los picos correspondientes a la lactosa monohidratada están presentes en el análisis correspondiente a la preparación comercial (ver Figura IV.15). Podemos ver que aparece un efecto exotérmico en el

¹¹⁵ Gentili, A.; Curini, R.; Cernia, E. y D'Ascenzo, G. (1997) *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **3**, 43-49.

¹⁸⁹ Sánchez-Montero, J.M.; Hamon, V.; Thomas, D. y Legoy, M.D. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1078**, 341-350.

intervalo comprendido entre 164 °C y 179 °C con un pico a 172 °C. Este efecto ya había sido observado por Berlin y col.,²⁵¹ cuando trabajaban con muestras contenidas en recipientes sellados y que asociaron con la disolución de lactosa liberada en el agua y al cambio de la α -lactosa a β -lactosa. Sin embargo, en nuestro caso los ensayos se realizaron con muestras contenidas en recipientes abiertos y con un flujo de N₂, apareciendo igualmente este pico exotérmico. Pensamos que quizá se debiera a la combustión de la lactosa monohidratada, ya que resulta difícil admitir en nuestras condiciones la disolución de la lactosa en sí misma. No obstante, este fenómeno es irrelevante para nuestro trabajo. Lo importante es indicar que el pico endotérmico observado en la Figura IV.15 a T^a < 100 °C, no se debe a la lactosa y sí a la enzima que se deshidrata.

Figura IV.16. Curvas de ATG y ATD para la lactosa monohidratada.



Teniendo en cuenta la reacción de deshidratación de la lactosa monohidratada:



y la pérdida de peso asociada al pico de 144 °C, el porcentaje de lactosa en la LCRC se puede

²⁵¹ Berlin, E.; Kliman, P.G.; Anderson, B.A. y Pallansch, M.J. (1971) *Thermochim. Acta.*, 143-152.

determinar fácilmente, debido a la pérdida de peso de 1,3 % asociada al pico comprendido entre 139 °C y 159 °C (Figura IV.15) es provocada exclusivamente por la deshidratación de la lactosa monohidratada. De ello deducimos que la preparación comercial posee un 67,8 % de contenido proteico y contaminantes y 32,2 % de lactosa. Estos resultados pueden considerarse como bastante concordantes con los indicados por Sánchez-Montero y col.¹⁸⁹ Este resultado además ha sido comprobado²⁵² en base a las curvas de análisis termogravimétrico de muestras en las que se había mezclado LCRC y lactosa pura monohidratada en diferentes proporciones.

De estos resultados, podemos decir que en la enzima comercial liofilizada están presentes dos tipos de agua:

- el agua débilmente unida al sólido.

- el agua de hidratación fuertemente unida, que es exclusiva de la lactosa monohidratada añadida como aditivo por la casa comercial.

El primer tipo de agua se caracteriza porque se elimina con temperaturas menos elevadas que el agua de cristalización.

3. Lipasa de *Candida rugosa* semipurificada.

El siguiente paso de este estudio ha sido el análisis térmico de la lipasa de *Candida rugosa* con diferentes grados de purificación.

La LCRC se ha obtenido tal y como se describió en la *Parte experimental* a partir de una diálisis en agua con una membrana de corte de 12 KDa y posterior liofilización.

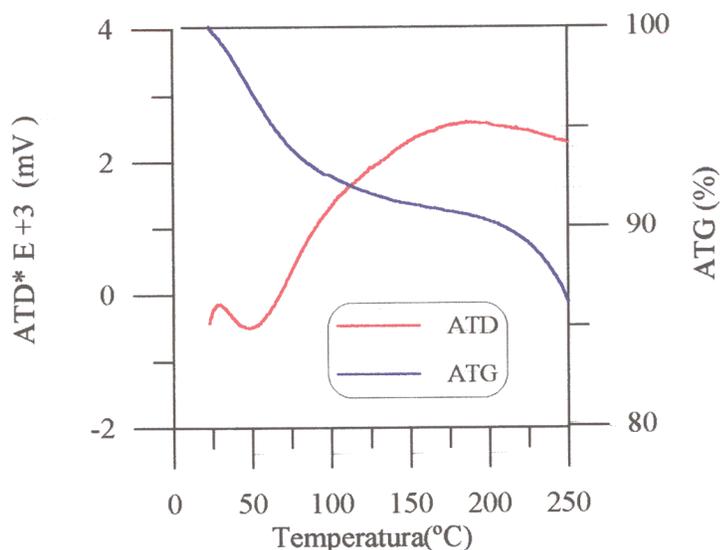
En principio, según se observa en el ATD en la Figura IV.17 que debido al proceso de

¹⁸⁹ Sánchez-Montero, J.M.; Hamon, V.; Thomas, D. y Legoy, M.D. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1078**, 341-350.

²⁵² Sinisterra, J.V. y Rojas, R. (aceptado, pendiente de publicación).

semipurificación no se observa ningún pico correspondiente a la lactosa monohidratada ya que ha sido eliminada. Por otro lado aparece por debajo de 200 °C un pico endotérmico que corresponde según el ATG a una pérdida de peso correspondiente a 9 % aproximadamente. El efecto endotérmico oscila en un intervalo comprendido entre 28 °C a 160 °C, y un pico a 52 °C. Este pico aparece a unos 20 °C por debajo de la temperatura a la que apareció el primer pico endotérmico en la curva del ATD de la LCRC (ver Figura IV.15). Por tanto, se confirma que con el proceso de semipurificación se ha retirado la lactosa monohidratada.

Figura IV.17. Curvas de ATD y ATG de LCRS.



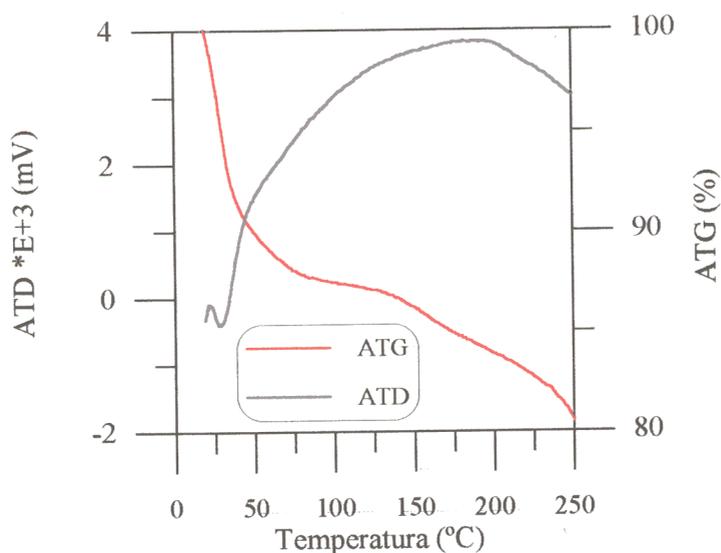
4. Lipasa A de *Candida rugosa*.

En la preparación comercial y semipurificada (LCRC y LCRS) no se puede determinar el número de moléculas de agua unido a la proteína, ya que aunque en la LCRS no hay lactosa, como se deduce del análisis térmico, la diálisis no elimina totalmente todos los contaminantes que puede tener la preparación; por eso, el siguiente paso en nuestro estudio fue realizar el análisis térmico de las isoformas puras, LCRA y LCRB, obtenidas por el método de purificación

diseñado por Rúa y col.¹⁷²

En la Figura IV.18 el ATD de LCRA muestra un pequeño pico a unos 29 °C, en el intervalo comprendido entre 19 °C y 100 °C, correspondiente a una pérdida de peso de 12,8 % según lo muestra la curva de ATG.

Figura IV.18. Curvas de ATD y ATG de la LCRA.

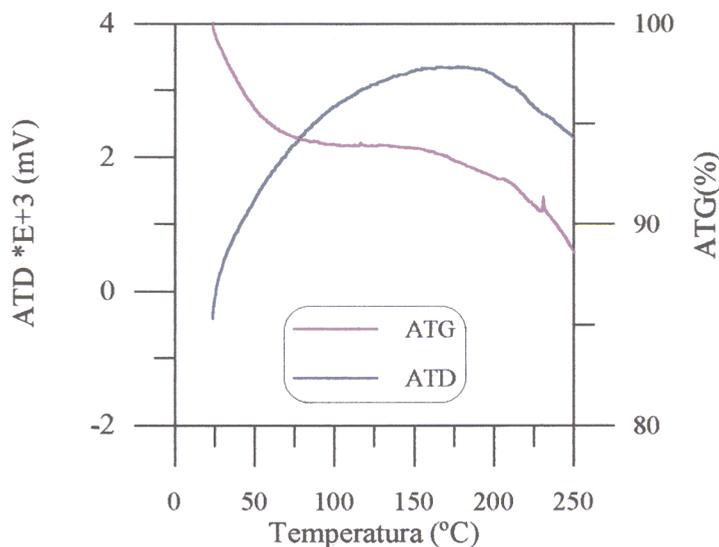


5. Lipasa B de *Candida rugosa*.

Para LCRB no se observa ningún efecto térmico en la curva de ATD (ver Figura IV.19). Sin embargo, la curva de ATG muestra un paso marcado en el intervalo comprendido entre 26 °C a 110 °C, correspondiente a una pérdida de peso de 6,2 %, según el análisis ATG.

¹⁷² Rúa, M.; Díaz-Mouriño, T.; Fernández, V.M.; Otero, C. y Ballesteros, A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1156**, 181-189.

Figura IV.19. Curvas de ATG y ATD de LCRB.



A partir de las curvas de ATG y ATD se deduce que las moléculas de agua de las isoformas LCRA y LCRB están débilmente unidas a la proteína. Es más fácil retirar el agua de las isoformas puras que la presente en la preparación comercial o la preparación semipurificada, ya que el pico endotérmico aparece con temperaturas más bajas en LCRA (a 29 °C) y LCRB (donde no aparece pico endotérmico) que en la LCRS (a 52 °C) y LCRC (144 °C). Es posible que sean las impurezas presentes en LCRS y sobre todo en LCRC las que retienen moléculas de agua de una manera más fuerte, que en el caso de las enzimas puras, donde se han eliminado a lo largo del proceso de purificación.

Por otro lado, la presencia de una mayor proporción de azúcares en la LCRA (8%) favorece la existencia de mayor cantidad de agua en el liófilo que en la LCRB. El cálculo realizado, teniendo en cuenta el peso molecular descrito por Rúa y col.¹⁷² para las dos isoenzimas (64 KDa para LCRA y 62 KDa para LCRB) da como resultado una relación de moléculas de agua

¹⁷²Rúa, M.; Díaz-Mouriño, T.; Fernández, V.M.; Otero, C. y Ballesteros, A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1156**, 181-189.

por molécula de proteína mayor en la LCRA, con 522; que en la LCRB, con 220; por tanto, el contenido en agua de LCRA es mayor que en la LCRB. Asumiendo que la molécula de agua tiene una esfera de 0,9 Å de radio y la lipasa de *Candida rugosa* consiste en una esfera de 69 Å de diámetro,²⁴⁹ se puede decir que el agua cubre un 10 % de la superficie de LCRA y tan sólo un 4 % de la LCRB. El estudio del agua unida a las proteínas en estado sólido nos muestra una mayor diferencia entre la LCRA y la LCRB, lo cual se deberá ahora fundamentalmente a su diferente grado de hidratación.

6. Lipasa UAB.

En la Figura IV.20 se muestran los resultados correspondientes a la lipasa UAB. Su ATG/ATD es diferente del de la lipasa comercial (LCRC) a pesar de tener un contenido en proteína similar (Tabla IV.1) y de haberse dializado frente a una disolución de lactosa. No obstante, no se aprecian aquí picos claros de la lactosa monohidratada (Figura IV.15) a 135 °C y 220 °C. De ello se deduce que en la muestra liofilizada no existe esta especie. Esto ya ha sido comprobado por otro miembro de nuestro grupo en el caso de la lipasa de *Rh.miehei*.²⁵³

El ATG/ATD muestra que la lipasa UAB tiene una mayor hidratación, pues la primera pérdida de peso de 10 % está asociada al pico entre 20 y 150 °C. Este agua parece estar muy fuertemente unida al sólido. El pico a 169 °C es debido al medio UAB²⁵³ y el que aparece a 200 °C se asocia a la descomposición de la muestra.

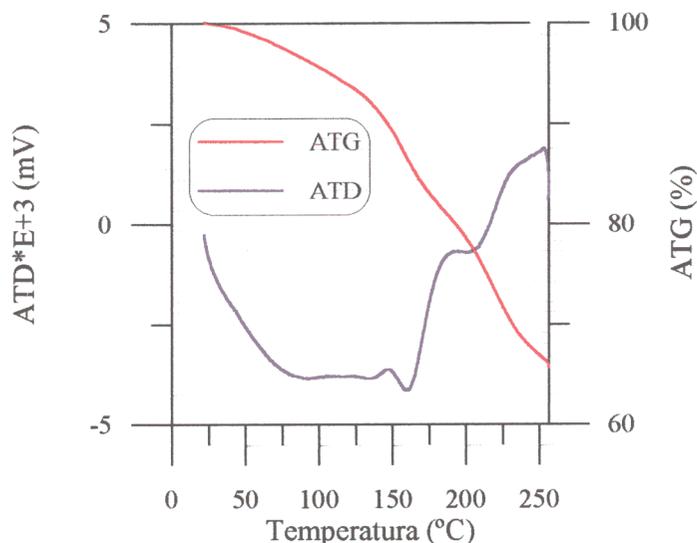
La única explicación puede ser que al tener una diferente composición en isoformas (Tabla IV.6) provoque que el agua sea más fuertemente retenida en el caso de la lipasa UAB que

²⁴⁹ Protein Data Bank.

²⁵³ Carballeira, D. *Tesina de Licenciatura* (1999). Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

en el caso de la LCRC.

Figura IV.20. Curvas de ATG y ATD de la lipasa UAB.



En la Tabla IV.20 se representa la pérdida de peso experimentada en cada una de las preparaciones analizadas y deducida a partir del análisis ATG. Estos resultados pueden arrojar nueva luz a la hora de interpretar los resultados de la Tabla IV.7 donde se comparaban las actividades de las enzimas liofilizadas en la síntesis del oleato de heptilo. Así el menor grado de hidratación del liofilo LCRB puede explicar su mayor actividad ($6,0 \cdot 10^{-3}$ mmol ester/mg de proteína·h) comparada con la LCRB (0,048 mol ester/mg proteína·h). Lo mismo puede decirse de la LCRC más activa y menos hidratada que el liofilo de la lipasa LCRS, que es menos activa.

7. Dextranos de diferente peso molecular.

En la Figura IV.21 correspondiente al análisis de un dextrano de 6 KDa de peso molecular y en la Figura IV.22 perteneciente a un dextrano de 10 KDa de peso molecular podemos observar que existe un comportamiento similar en ambas muestras. Aparece un pico endotérmico que, según el ATG, corresponde a una pérdida de peso de aproximadamente 10 %. Este pico

endotérmico oscila entre 23 °C y 100 °C, con un pico endotérmico alrededor de 60 °C.

Figura IV.21. Curvas de ATG/ATD de un dextrano de 6 KDa de peso molecular.

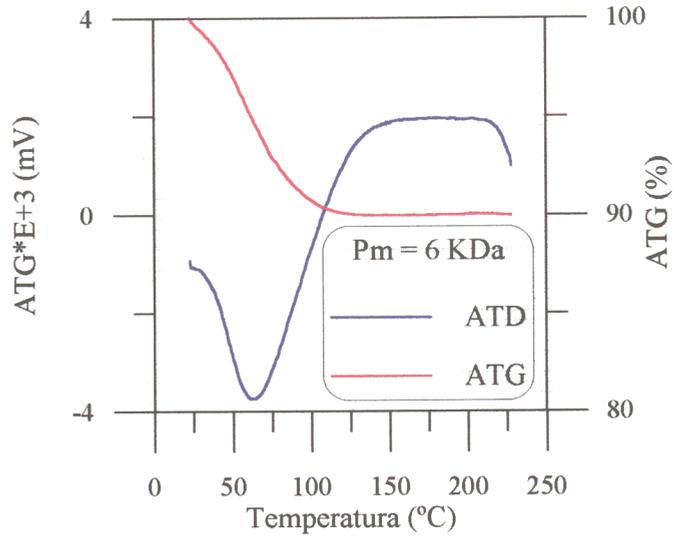


Figura IV.22. Curvas de ATG/ATD de un dextrano de 10 KDa de peso molecular.

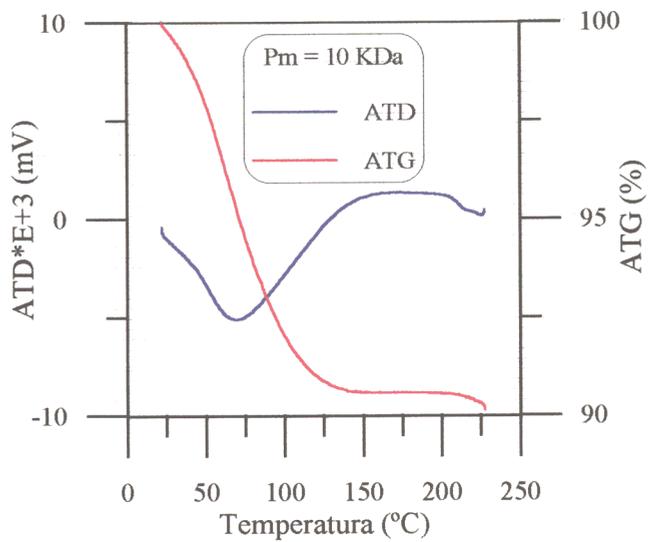


Tabla IV.20. Pérdida de peso de lipasas de *Candida rugosa* con diferente grado de purificación.

Enzima	T (°C) ^a	Pérdida de peso (%)
LCRC	23-135 (71°C)	-4,5 (-6,4) ^b
LCRS	26-160 (52°C)	-9
LCRA	15-160 (29°C)	-12,8
LCRB	26-100 °	-6,2
UAB	20-150 °	-10

^a Intervalo de temperatura para el paso y pico endotérmico asociado (entre paréntesis).

^b Referido a la proteína.

^c Sin máximo definido.

Estos resultados pueden arrojar nueva luz a la hora de interpretar los que aparecen en la Tabla IV.7, donde se comparaban las actividades de las enzimas liofilizadas en la esterificación del oleato de heptilo.

Así el menor grado de hidratación del liófilo LCRB puede explicar su mayor grado de actividad (0,0060 mmol ester/mg proteína·h) comparada con la de LCRA (0,048 mmol ester/mg proteína·h).

Lo mismo puede decirse de la LCRC, más activa y menos hidratada que el liófilo LCRS, que es menos activa.

2.3. ISOTERMAS DE SORCIÓN DE AGUA.

1. Isotherma de adsorción de agua de la preparación enzimática sólida en aire.

El valor de a_w puede ser medido por numerosos métodos tal y como se comentó en la *Introducción* de esta Memoria. Para nuestro estudio se ha empleado un captador electrónico de humedad cuyo funcionamiento se basa en la conductividad de un electrolito que está condicionada por la presión parcial de vapor de agua. Las medidas se efectuaron después de la calibración del aparato con la ayuda de una serie de sales patrón de a_w conocida (ver Tabla III.5).

En la Figura IV.23 se representa la isoterma de adsorción de agua de la lipasa comercial de *Candida rugosa*. A partir de su perfil podemos conocer el estado de hidratación de la enzima y cual es la disposición del agua en el entorno del biocatalizador.

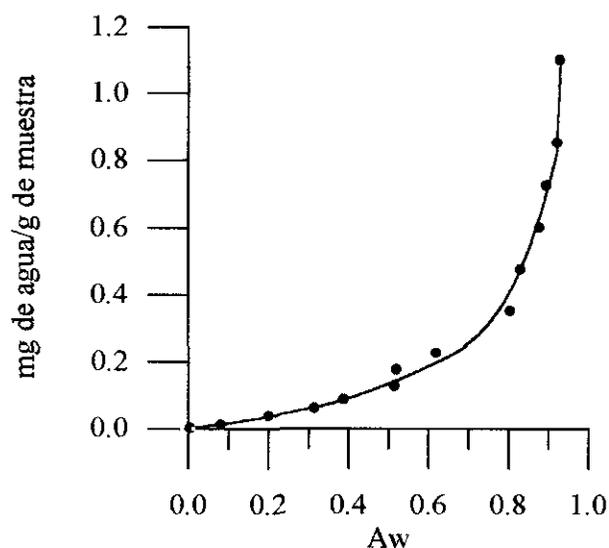
Puede observarse en el perfil de esta isoterma la existencia de dos zonas:

i) Una zona comprendida entre los valores de $a_w \approx 0$ y $a_w = 0,6$ que puede considerarse lineal. Esta zona corresponde a la formación de la monocapa y se caracteriza porque su final representa el contenido de agua necesario mínimo para que la enzima presente su configuración catalíticamente activa. La alteración de esta monocapa conllevaría la correspondiente pérdida de actividad.

ii) Una segunda zona donde el biocatalizador estaría cubierto por multicapas de agua. Esta zona correspondería al tramo comprendido entre un valor de $a_w = 0,6$ hasta el estado de saturación en agua de la proteína. La primera zona descrita en la isoterma teórica (ver Figura I.4), correspondiente al agua muy fuertemente unida por uniones hidrógeno o agrupamientos polares de la proteína no puede observarse dado el error experimental de medida y al reducido número

de moléculas de agua existentes en esta zona y que se estima en la bibliografía en menos de 0,1 % en peso referido a la muestra.¹¹⁷

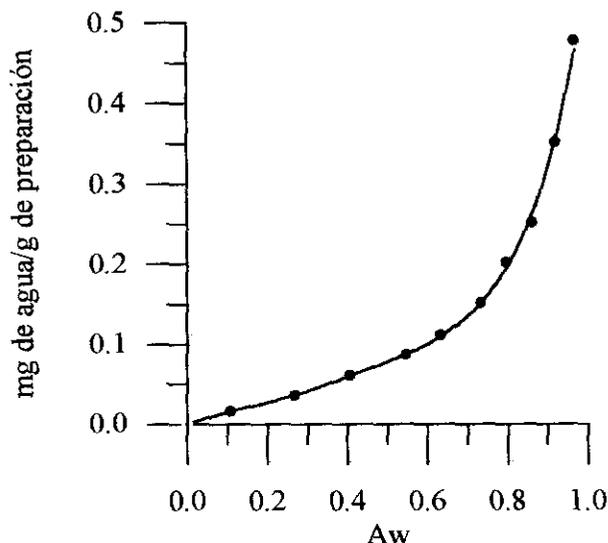
Figura IV.23. Isotherma de adsorción de agua de la lipasa de *Candida rugosa* (LCRC).



Como se ha comentado a lo largo de esta Memoria, la preparación suministrada por Sigma contiene impurezas como la lactosa y otros contaminantes como pequeños péptidos que influyen en el estado de hidratación de la preparación y modifican la isoterma de adsorción de agua. Ya que estas sustancias, de naturaleza hidrofílica, también reaccionan con el agua. Por eso, se procedió a la realización de la isoterma de adsorción de una muestra de lipasa de *Candida rugosa* semipurificada (LCRS) (ver Figura IV.24).

¹¹⁷ Gubicza, L. y Kelemen-Horvath, I. (1993) *J. Mol. Catal.*, **84**, L27.

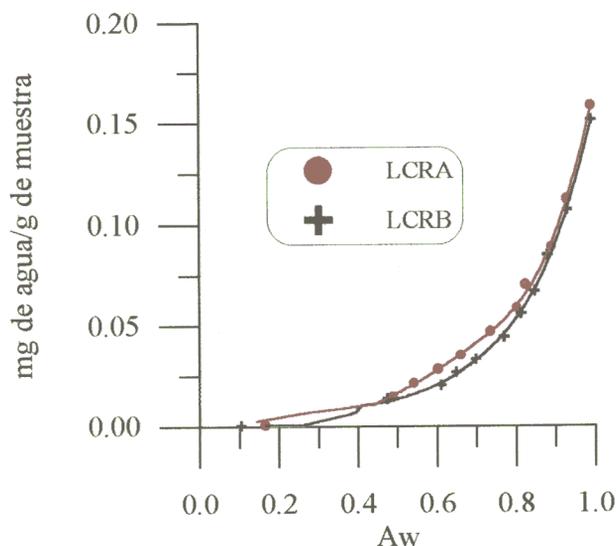
Figura IV.24. Isoterma de adsorción de agua de la lipasa de *Candida rugosa* semipurificada (LCRS).



Puede comprobarse que tras la eliminación de la lactosa el perfil de la isoterma ha cambiado notablemente en relación a la preparación comercial. Podemos comprobar que se necesita una menor cantidad de agua para alcanzar el mismo valor de a_w . La parte de la curva que corresponde al agua que forma la monocapa está comprendida entre un valor de $a_w \approx 0$ y $a_w \approx 0,6$, que corresponde a un contenido en agua de 0,1 mg de agua/g de muestra; mientras que en el caso de LCRC, para alcanzar el mismo valor de $a_w = 0,6$, necesitaba 0,22 mg de agua/g de muestra. Otra diferencia significativa estaría relacionada con el segundo tramo de la curva, que termina cuando la enzima alcanza el estado de saturación en agua con una $a_w \approx 1$. Sin embargo, con LCRS este estado se alcanza con 0,5 mg de agua/g de muestra, mientras que en la preparación comercial, necesitaba el doble (1 mg de agua/g de muestra) para llegar a esta saturación. Los resultados de las Figuras IV.23 y IV.24 indican que para hidratar totalmente la superficie del sólido (LCRS) se necesita la mitad de agua que para el caso de la LCRC. Esto puede deberse a que en el proceso de purificación se han eliminado iones y sustancias hidrófilas que adsorben mucho agua.

Debemos indicar que la contradicción aparente entre estos resultados y los obtenidos por análisis termogravimétrico (Tabla IV.20), no deben considerarse como tales, pues se trata de dos metodologías de análisis totalmente diferentes. Mientras el ATG estudia la pérdida de peso de la totalidad del sólido, la técnica de las isothermas de adsorción estudia la hidratación progresiva de la superficie del sólido, que es la que forma la superficie catalítica útil en contacto con el medio de reacción. No obstante, el proceso de semipurificación no proporciona una preparación proteica de total pureza, porque puede haber otras proteínas y péptidos de naturaleza no lipásica que no se han eliminado en la diálisis lo cual nos imposibilita medir el grado de hidratación de la lipasa sólida. Por eso, se procedió a la realización de la isoterma de adsorción de agua de las isoformas puras, LCRA y LCRB (ver Figura IV.25).

Como se observa en el perfil de las curvas (Figura IV.25), la cantidad de agua con la que se satura cada preparado es aproximadamente 0,15 mg de agua/g de muestra para alcanzar un valor de $a_w \approx 1$. Este contenido en agua es muy inferior al requerido para la LCRS (0,5 mg de agua/g de muestra) y está por debajo del exigido para LCRC (1,1 mg de agua/g de muestra). Con ello queda confirmado a través del proceso de semipurificación y sobre todo con el proceso de purificación se han eliminado sustancias hidrofílicas que pueden alterar el estado de hidratación del biocatalizador sólido.

Figura IV.25. Isotermas de adsorción de agua de las isoformas puras LCRA y LCRB.

Por otro lado, las isotermas de adsorción de agua de ambas isoenzimas semipurificadas son muy semejantes debido a la similitud estructural que presentan LCRA y LCRB con un 84 % de homología,¹⁷³ lo cual provoca que la superficie de las partículas liofilizadas sólidas presente un grado muy similar de susceptibilidad frente a la hidratación.

En el análisis de las isotermas de sorción de agua de estas isoenzimas se comprueba que el perfil de la curva correspondiente a LCRB transcurre por debajo del que pertenece a LCRA, esto es, que para llegar al mismo valor de a_w , la LCRB necesita la adición de menos agua que la LCRA, por lo que esta última tiene mayor carácter hidrofílico. A modo de ejemplo, podemos observar que para una $a_w = 0,7$, la LCRA adsorbe aproximadamente 0,14 moles de agua por mol de proteína, mientras que la LCRB sólo requiere 0,1 moles de agua por mol de proteína. Estos datos son coincidentes con los obtenidos tanto por RMN-1H en solución (Sección IV.2.2.1) o por análisis termogravimétrico (Sección IV.2.2.2) y que han de correlacionarse con el mayor

¹⁷³ Lotti, M.; Grandori, R.; Fusetti, F.; Longhi, S.; Brocca, S.; Tramontano, A. y Alberghina, L. (1993) *Gene*, **124**, 45-55.

contenido en azúcares de LCRA que LCRB,¹⁷² que hace que la primera adsorba más agua que la segunda.

También se realizó la isoterma de adsorción de agua de la lipasa UAB, obtenida tal y como se describió en la *Parte experimental* monitorizando las condiciones de fermentación. En este caso, presentamos el perfil de la curva en la Figura IV.26 comparándola con la LCRC, ya que ambas deben considerarse enzimas no purificadas.

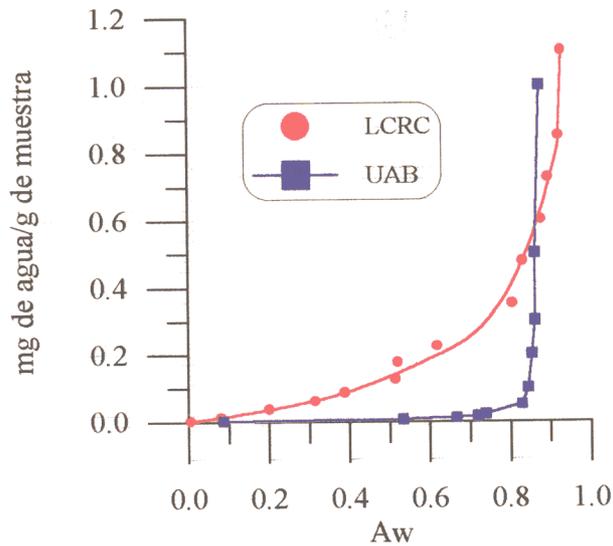
Podemos observar que el tramo correspondiente a la formación de la monocapa de agua llega hasta un valor de $a_w \approx 0,8$ para la UAB, mientras que para LCRC es 0,6. Esto se logra con la adición de 0,03 mg de agua/g de UAB, mientras que en el caso de LCRC se necesita 0,35 mg de agua/g de muestra, lo cual indica que la UAB necesita 10 veces menos agua que la LCRC para completar la primera capa de hidratación necesaria para adquirir su conformación catalíticamente activa en la superficie del sólido. Se observa además que a partir de $a_w = 0,8$, el valor de a_w no varía notablemente aún añadiendo cantidades crecientes de agua, lo cual significa que la preparación ya se encuentra en un estado de saturación. Este se alcanza con un contenido en agua ($\approx 0,5$ mg de agua/g de muestra) inferior al que requiere la LCRC ($\approx 1,1$ mg de agua/g de muestra). Es por ello por lo que la lipasa UAB presenta una pobre actividad en la síntesis del oleato de heptilo (Tabla IV.7) ya que con poca agua producida durante el proceso, el biocatalizador sólido estaría totalmente hidratado y no conduciría a la síntesis. Por el contrario, la LCRC puede absorber más agua y por ello es menos sensible a la desactivación por agua.

Estos resultados se relacionan fácilmente con la mayor pérdida de peso detectada por ATG en el caso de la lipasa UAB (- 10 %) que en el caso de la LCRC (- 4,5 %) (Tabla IV.20).

¹⁷² Rúa, M.; Díaz-Mouriño, T.; Fernández, V.M.; Otero, C. y Ballesteros, A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1156**, 181-189.

La lipasa UAB estaría más hidratada por lo que es más fácil llegar a una hidratación de la superficie en el caso de la lipasa comercial (LCRC).

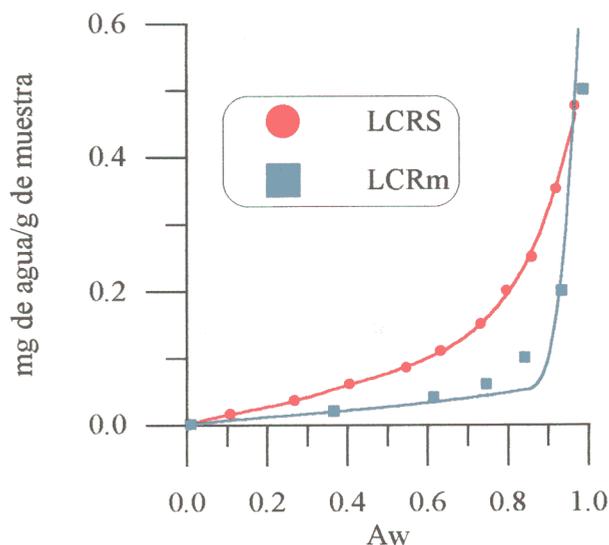
Figura IV.26. Isoterma de adsorción de agua de la lipasa UAB.



Para ver como afectaba a la isoterma de adsorción de agua la modificación con dextrano se realizó la isoterma de adsorción de agua de una preparación modificada no covalentemente de la LCRC con dextranos de 10 Kda (LCRm), para comprobar como afectaba al grado de hidratación la presencia de un dextrano y cómo influía en la interacción de la enzima con el agua. El perfil de la isoterma se muestra en la Figura IV.27, donde se compara con la isoterma de adsorción de agua de la LCRC, ya que fue esta preparación a partir de la cual se realizó este tipo de modificación.

Podemos observar que la isoterma correspondiente a la preparación modificada transcurre por debajo de la LCRC. De acuerdo con lo observado hasta ahora, hemos de decir que el dextrano unido no covalentemente a la enzima debe formar un sólido que retiene mucho agua, por lo cual la hidratación de la superficie del sólido se realiza con facilidad, necesitándose muy poco agua para lograrlo.

Figura IV.27. Isotherma de adsorción de agua de la preparación LCRS (50 mg) modificada no covalentemente con dextranos de 10 KDa (50 mg).



2. Isotherma de absorción de los disolventes.

En Figura IV.26 se representan las isotermas de absorción de agua de los diferentes disolventes empleados, caracterizados por tener diferente $\log P$ (Tabla IV.4) y en consecuencia distinta hidrofobicidad, como se comprueba al estudiar el diferente comportamiento que tiene cada uno de ellos frente al agua.

Podemos observar que cuanto más hidrofóbico es el disolvente, rechaza el agua hacia la fase vapor aumentando P_w para una misma cantidad de agua añadida. Por tanto, pequeñas adiciones de agua producen un gran aumento en la a_w en disolventes con alto $\log P$ como en el caso del isooctano ($\log P = 5,18$) y ciclohexano ($\log P = 3,44$). Se observa que el isooctano absorbe una mayor cantidad de agua que el ciclohexano para $a_w > 0,8$. Este aspecto podría explicarse en base a la geometría de las moléculas. Las moléculas pseudoesféricas de isooctano pueden aceptar más moléculas de agua en los espacios presentes entre las moléculas, mientras que las moléculas cíclicas de ciclohexano podrían presentar un empaquetamiento más compacto en estado líquido y por tanto admite una menor cantidad de agua.

En disolventes más hidrofílicos el cambio de pendiente en las curvas se produce con una mayor cantidad de agua añadida en relación a los disolventes hidrófobos. En el caso del 1,1,1-tricloroetano y el éter diisopropílico, la proximidad en el log P se manifiesta en la semejanza de la curva de absorción de agua, sin embargo, parece que según el perfil de la isoterma el éter diisopropílico es más hidrofóbico que el 1,1,1-tricloroetano debido a que la isoterma de éste último transcurre por valores inferiores de a_w , contrariamente a lo que indican sus valores de log P (2,49 y 1,52, respectivamente); la explicación a este hecho puede darse en base a que cuentan con diferente coeficiente de Hildebrand,²⁵⁴ cuyo valor es para el 1,1,1-tricloroetano de $9,5 \text{ cal/cm}^3$ y para el éter diisopropílico de $\delta = 7,1 \text{ cal/cm}^3$. Este valor está relacionado con el carácter polar del disolvente orgánico y favorece la interacción con moléculas polares como es el caso del agua. Con un valor alto de δ se absorbe mayor cantidad de agua por el disolvente orgánico, siempre que las otras propiedades físico-químicas permanezcan constantes. De esta manera, vemos que el 1,1,1-tricloroetano tiene mayor log P pero mayor δ que el éter diisopropílico, de acuerdo a su alto momento dipolar. Por tanto, el 1,1,1-tricloroetano, a altos valores de a_w absorbe un mayor contenido en agua (molécula polar) que el éter diisopropílico y por esto, el 1,1,1-tricloroetano parece más hidrofílico que el éter diisopropílico debido a que la isoterma de absorción de agua se inclina antes que en el caso del éter.

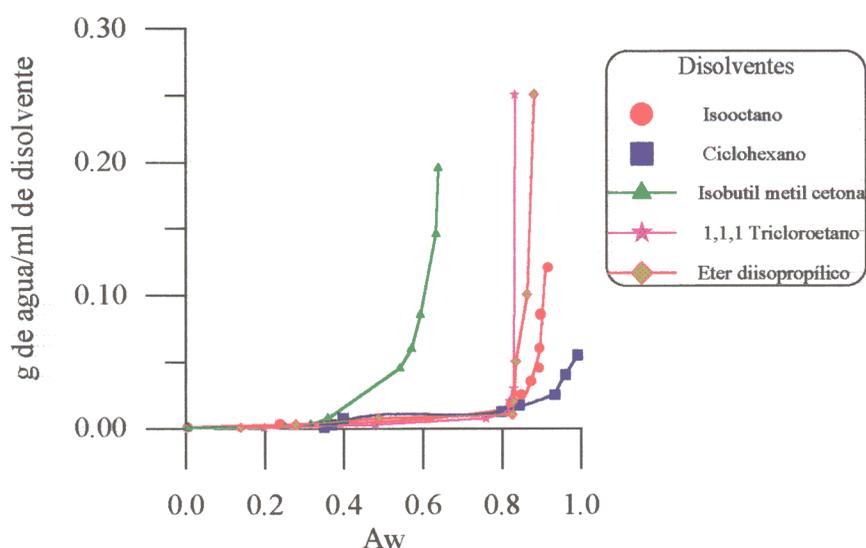
En el caso de la isobutil metil cetona, al ser el disolvente más hidrofílico de los estudiados (log P = 1,31), absorbe todo el agua añadida y por tanto un alto contenido de agua adicionada provoca pequeños incrementos en el valor de a_w . Así vemos que la adición de 0,08 g de agua/ml de disolvente da un valor de $a_w = 0,6$ para la isobutil metil cetona, mientras que para el isoocetano

²⁵⁴ Brink, L. y Tramper, J. (1985) *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1285-1269.

es de $a_w = 0,83$.

Queda demostrado de esta manera que, la isoterma de absorción de agua de un disolvente, está relacionada con la hidrofobicidad del mismo, representada por su log P. No obstante, hay que tener en cuenta otras propiedades físico-químicas del disolvente como es el caso del coeficiente de Hyldebrand o la forma de la molécula.

Figura IV.28. Isotherma de absorción de agua de los disolventes.



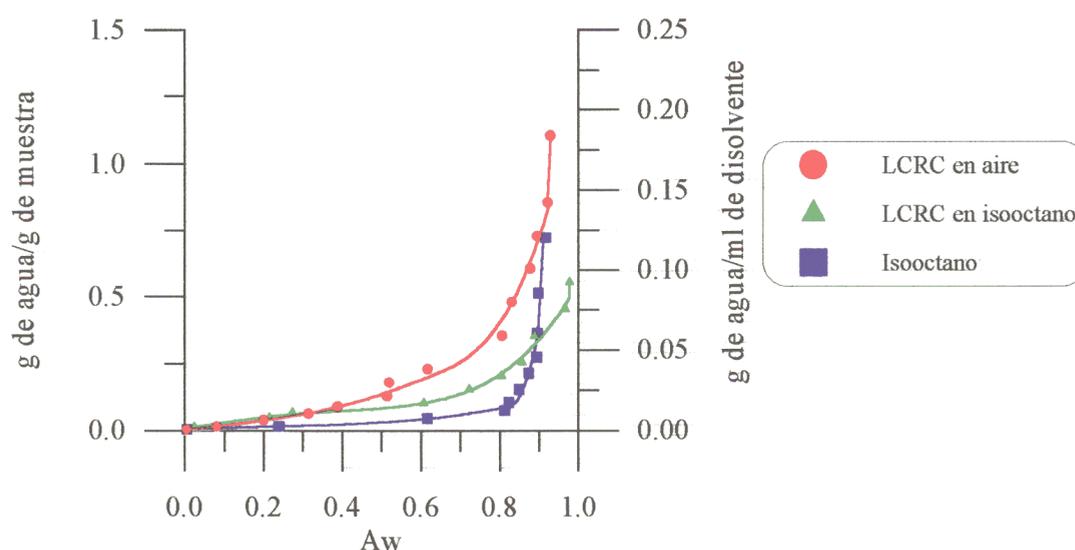
3. Isotherma de sorción de la mezcla de la lipasa y disolvente orgánico.

La isoterma de absorción de agua del biocatalizador en el disolvente se preparó a partir de 0,2 g de biocatalizador en presencia de 1 ml del correspondiente disolvente, ambos componentes desecados por separado, como se especificó en la *Parte experimental*. Esta proporción fue diseñada experimentalmente porque corresponde al estado del sólido sumergido en el disolvente y representa de esta manera las condiciones que puede tener el microentorno del biocatalizador. Sobre esta mezcla se fueron añadiendo cantidades crecientes de agua medidas en microlitros; en este caso se ha optado por referirlo al peso del biocatalizador sólido, es decir, g de agua por g de disolvente. La primera zona de la curva teórica (ver Figura I.3) no puede verse

al igual que ocurría en el caso de la isoterma de adsorción de agua de la enzima debido al pequeño número de moléculas de agua que están presentes,¹¹⁷ apreciándose únicamente las dos últimas zonas de esta curva.

En la Figura IV.29 se muestran los resultados obtenidos con LCRC en presencia de isooctano, caracterizado por ser un disolvente de alta hidrofobicidad. El perfil de la isoterma se presenta junto con la isoterma de adsorción de la lipasa en aire y junto a la isoterma de absorción del disolvente.

Figura IV.29. Isooterma de sorción de agua de la LCRC en isooctano.



Se observa que el comportamiento del biocatalizador humedecido por el disolvente es diferente del que presentan ambos componentes por separado. Puede comprobarse cómo la isoterma de adsorción de la enzima en aire se cruza para un valor de $a_w = 0,32$ con la isoterma de sorción de la enzima en el disolvente. Además vemos que para valores de a_w inferiores a 0,32, la isoterma de LCRC en isooctano es ligeramente superior a la isoterma de la LCRC en aire; mientras que para valores de a_w superiores a 0,32, ocurre justamente lo contrario. Podemos

¹¹⁷ Gubicza, L. y Kelemen-Horváth, I. (1993) *J. Mol. Catal.*, **84**, L27.

justificar este comportamiento en base a que en la primera zona de la isoterma el disolvente se encontraría seco y el biocatalizador deshidratado y ambos estarían en una situación de avidez por el agua para conseguir un estado de saturación para el disolvente y de rehidratación para el biocatalizador. Por tanto, el sistema de enzima y disolvente necesita más agua para llegar al mismo valor de a_w que en el caso de la LCRC sola. En la segunda zona, el isooctano está saturado en agua y rechaza nuevas adiciones de moléculas de agua evitando por otro lado la hidratación del biocatalizador. Por tanto, en esta zona el biocatalizador está menos hidratado que cuando está solo, ya que alcanza el mismo valor de a_w con una menor cantidad de agua.

En el caso de la isoterma de sorción de la LCRC en ciclohexano, los resultados se muestran en la Figura IV.30. En este caso podemos comprobar que al tratarse de un disolvente lipóide también tiene un comportamiento semejante al caso antes discutido. Al tener características menos hidrofóbicas, el valor de a_w donde la isoterma de sorción de agua de la LCRC en ciclohexano se cruza con la isoterma de adsorción de agua de la LCRC en aire es de 0,66, superior al caso del isooctano ($a_w = 0,32$). Igualmente podemos ver que para valores de a_w inferiores a 0,66 la isoterma de la LCRC en ciclohexano es superior a la de la LCRC en aire debido como hemos comentado anteriormente a que el sistema formado por el biocatalizador con el disolvente necesita más agua que en el caso de la enzima en aire para llegar al mismo valor de a_w . La explicación a este hecho es que tanto el disolvente que está seco, como el biocatalizador, que está deshidratado, necesitan agua para recuperar su estado natural. De la misma manera, para valores de a_w superiores a 0,66 es la isoterma de LCRC en aire la que tiene valores mayores ya que el disolvente ya se ha saturado en agua y rechaza nuevas adiciones de moléculas de agua enviándolas hacia el biocatalizador; por eso a partir de este valor de a_w el sistema formado por la LCRC y el ciclohexano necesita menos cantidad de agua para llegar al mismo valor de a_w que

en el caso de la isoterma de adsorción de LCRC en aire.

Figura IV.30. Isotherma de sorción de agua de LCRC en ciclohexano.

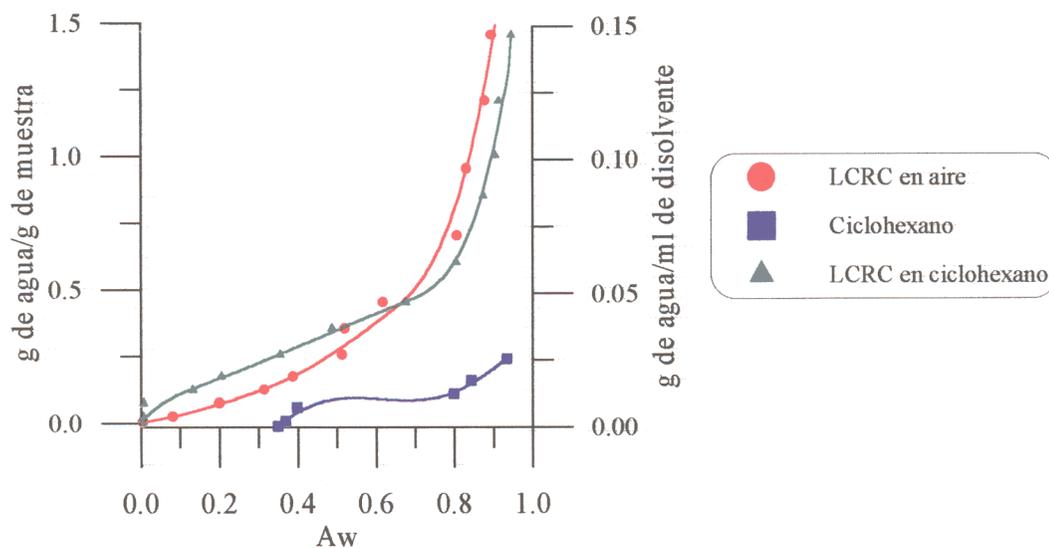
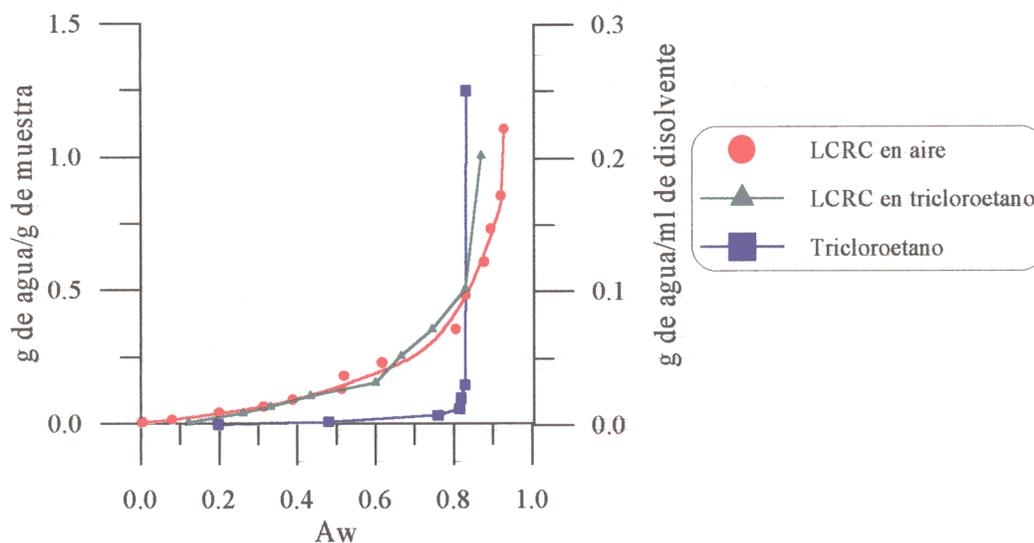


Figura IV.31. Isotherma de sorción de agua de la LCRC en 1,1,1-tricloroetano.

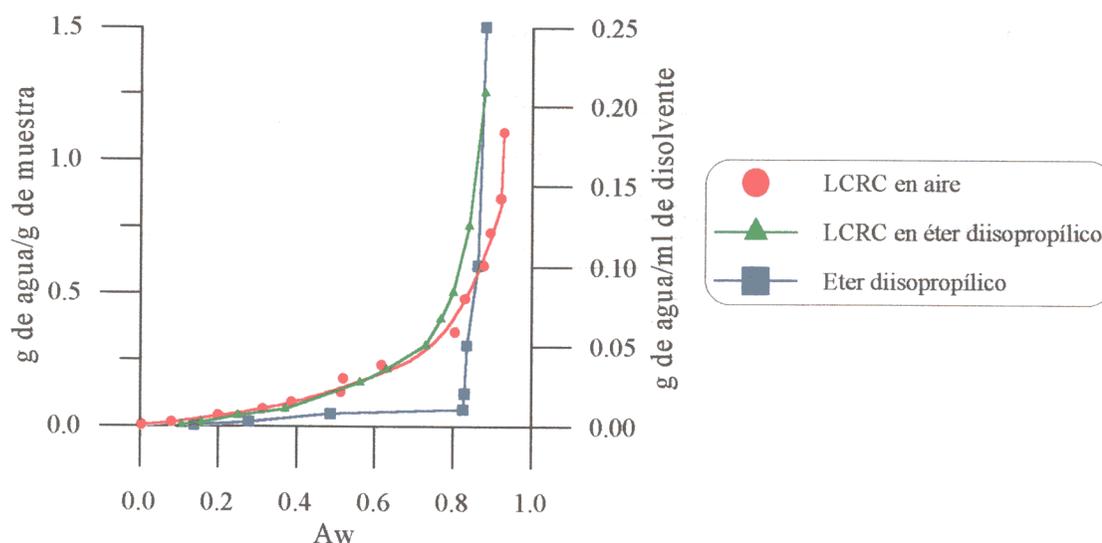


En el caso de la isoterma de sorción de agua de la LCRC en 1,1,1-tricloroetano (ver Figura IV.31) el perfil de la curva cuando el biocatalizador está sólo también varía de cuando está en presencia de este disolvente de características más hidrofílicas que los anteriores, pues tiene

un $\log P = 2,49$. En este caso, el valor de a_w donde se produce el corte de ambas curvas se produce a 0,68, correspondiendo aproximadamente a una adición de 0,48 g de agua/g de muestra.

Para el caso de la isoterma de sorción de agua de la LCRC en éter diisopropílico ($\log P = 1,52$) se representa en la Figura IV.32. El valor de a_w en el que se produce el cruce de la isoterma de adsorción del biocatalizador en aire con la isoterma de sorción de LCRC en el disolvente es 0,7, y corresponde aproximadamente a una adición de 0,48 g de agua/g de muestra.

Figura IV.32. Isotherma de sorción de agua de LCRC en éter diisopropílico.

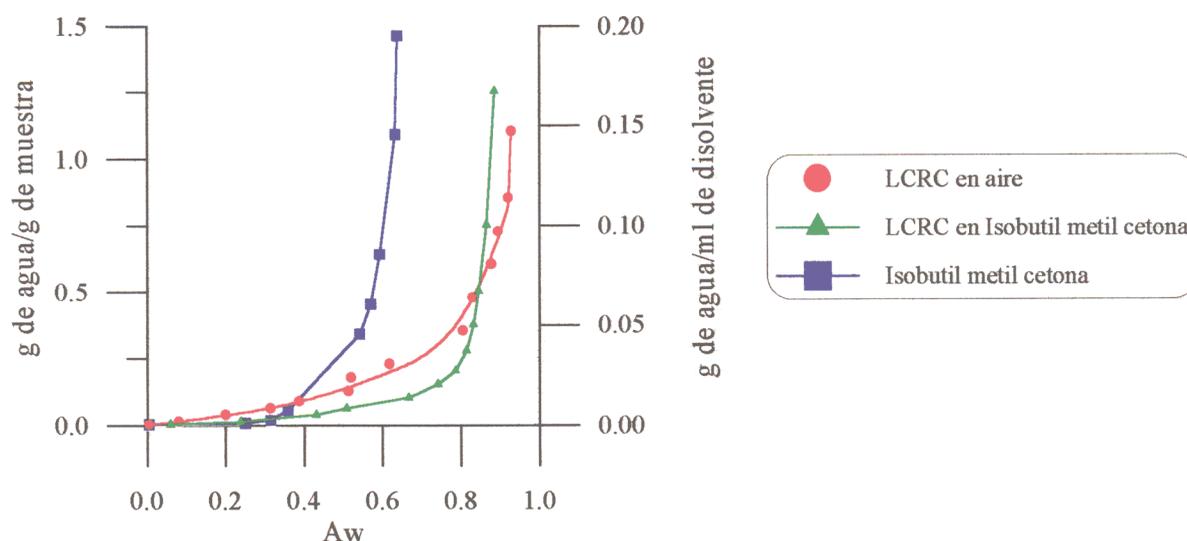


En estos dos últimos casos de comportamiento tan parecido observamos que en principio el disolvente del sistema absorbe todo el agua, debido a su hidrofília, hasta que se hidrata mínimamente. Por ello, el sistema se comporta como si sólo estuviera presente el disolvente.

Por último, en el caso de un disolvente más hidrofílico como es el caso de la isobutil metil cetona ($\log P = 1,31$) observamos un desplazamiento del valor de a_w donde se cortan ambas curvas hacia valores más altos, en este caso es de 0,85. El perfil de las isoterma de sorción de la LCRC en este disolvente se muestra en la Figura IV.33, donde se observa que a valores de a_w superiores la a_w donde se produce el cruce de las dos isoterma, la curva del sistema formado por

LCRC con el disolvente transcurre por encima de la curva correspondiente al biocatalizador sólo, debido a la alta hidrofilia del disolvente que tiende a absorber grandes cantidades de agua en comparación con los otros disolventes estudiados.⁸¹ Esto podría explicar la razón por la que disolventes con $\log P < 2$ no son útiles para reacciones de esterificación.^{1,13}

Figura IV.33. Isoterma de sorción de agua de LCRC en isobutil metil cetona.



McMinn y col.⁴⁷ también han realizado estudios comparativos del comportamiento de diferentes suspensiones enzimáticas en diferentes disolventes. Estos autores afirman que a bajos valores de a_w el perfil de la isoterma es muy similar en todas las suspensiones estudiadas; considerando que este comportamiento se puede predecir empleando un modelo termodinámico en el que se asume que el agua se une selectivamente a residuos ionizables de la superficie de la proteína. En nuestro caso, este comportamiento a bajos valores de a_w también es similar, pero hay

⁸¹De la Casa, R.M.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1996) *Biotechnol. Lett.*, **18**, 19.

¹ Vermüe, M.H. y Tramper, J. (1995) *Pure & Appl. Chem.*, **67**, 345-373.

¹³ Arroyo, M. y Sinisterra, J.V. (1994) *J. Org. Chem.*, **59**, 4410-7.

⁴⁷ McMinn, J.H.; Sowa, M.J.; Chanick, S.B.; Paulaitis, M.E. (1993) *Biopolymers*, **33**, 1213-1224.

que tener en cuenta que para la realización de cada isoterma se partió de un biocatalizador totalmente seco; para ello, previamente había sido sometido a un tratamiento de desecación en P_4O_{10} y en contacto con una bomba de vacío; por lo que su avidez por el agua es patente en los primeros tramos de cada isoterma ensayada.

Por tanto, a la hora de determinar la cantidad de agua necesaria para que la enzima presente su conformación catalíticamente activa en medio orgánico, es necesario deducir la cantidad de agua que necesita a partir de la isoterma de sorción de agua del biocatalizador en el disolvente elegido, ya que como hemos podido comprobar la isoterma del sistema es diferente de la que tiene el disolvente aislado y de la que tiene la enzima por separado. Por tanto, las isotermas de cada uno de los componentes no pueden emplearse para describir el nivel de hidratación del microentorno del biocatalizador sólido en el disolvente de referencia.²⁴⁸

Esto contradice los resultados expuestos por Lee y col.²⁵⁵ que al estudiar el efecto de a_w en la hidratación del biocatalizador y en la velocidad de reacción de la enzima en disolventes orgánicos, consideran que las isotermas de sorción de la proteína en medio orgánico no tienen dependencia significativa con las propiedades del disolvente o de la naturaleza de la proteína. Si bien, estos autores sí confirmaron que la relación entre la velocidad enzimática y la a_w cambió en función de las propiedades del disolvente empleado como medio de reacción, tales como hidrofobicidad y la solubilidad del agua en el disolvente.

Por otro lado Zaks y Klibanov⁴⁶ han confirmado que es a través de las isotermas de sorción de agua de un biocatalizador en el seno de un disolvente, el mejor método para estimar

²⁴⁸ Gubicza, L. y Kelemen-Horváth, I. (1993) *J. Mol. Catal.*, **84**, L27.

²⁵⁵ Lee, S.B.; y Kim, K.-J. (1995) *J. Ferment. Bioeng.*, **79(5)**, 473-8.

⁴⁶ Zaks, A. y Klibanov, A.M. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 8017-8021.

el contenido de agua que se debe añadir a un sistema para obtener la máxima actividad catalítica y que es la cantidad de agua que rodea a la superficie de la enzima sólida la que influye directamente en su actividad.

De esta manera, podemos decir que en el caso de los disolventes hidrófobos estudiados (con $\log P > 3$) cuando el valor de a_w es superior a la a_w donde se cortan ambas curvas, la presencia del disolvente en el sistema constituye una barrera para que se dé la hidratación del biocatalizador; por ello, se alcanza el mismo valor de a_w con menos agua añadida que en el caso de la isoterma del biocatalizador sólo. Sin embargo, en el caso de los disolventes hidrofílicos estudiados, donde $1,0 < \log P < 3,0$, por encima de la a_w donde se produce el corte de la isoterma del biocatalizador en aire con la del biocatalizador en disolvente lo que ocurre es que el sistema sigue absorbiendo todo el agua que se le añade debido a la presencia de un disolvente hidrofílico y por ello, la isoterma del sistema formada por enzima y disolvente está más desplazada a la izquierda asemejándose al perfil de la isoterma del disolvente.

Así pues podemos decir que sólo en los entornos del punto de corte de ambas isotermas, es donde el sistema formado por biocatalizador y disolvente presenta un comportamiento diferente al que tiene el disolvente aislado, que es el componente mayoritario del sistema. En valores diferentes a este valor de a_w , es el disolvente el que controla principalmente el comportamiento del sistema.⁸¹

El valor de a_w en que se produce el cruce de ambas isotermas depende de la lipofilia del disolvente como se indica en la Tabla IV.21, siendo mayor cuando aumenta la hidrofilia del disolvente.

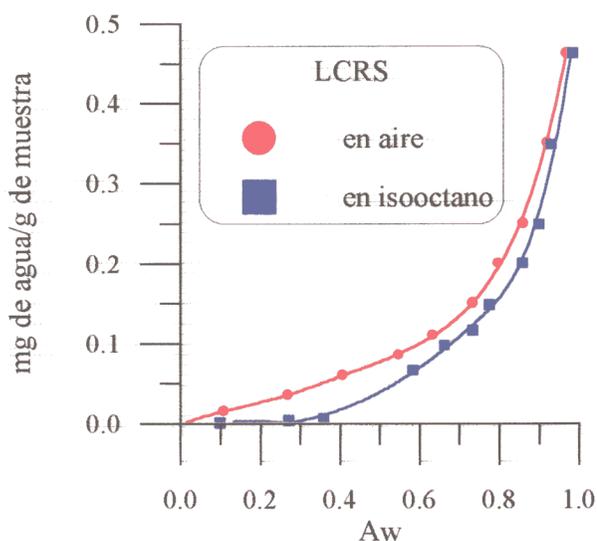
⁸¹ De la Casa, R.M.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1996) *Biotechnol. Lett.*, **18**, 13-18.

Tabla IV.21. Valores de log P y a_w del punto de corte para los disolventes empleados con LCRC.

Disolvente	log P	a_w corte
Isooctano	5,18	0,32
Ciclohexano	3,44	0,66
1,1,1-tricloroetano	2,49	0,68
Eter diisopropílico	1,52	0,7
Isobutil metil cetona	1,31	0,85

Para completar este estudio, se utilizaron diversas lipasas sólidas en distinto grado de purificación. La isoterma de sorción de agua de LCRCs en isooctano se muestra en la Figura IV.34, comparada con la correspondiente isoterma de adsorción de este preparado en aire.

Figura IV.34. Isoterma de sorción de LCRCs en isooctano.

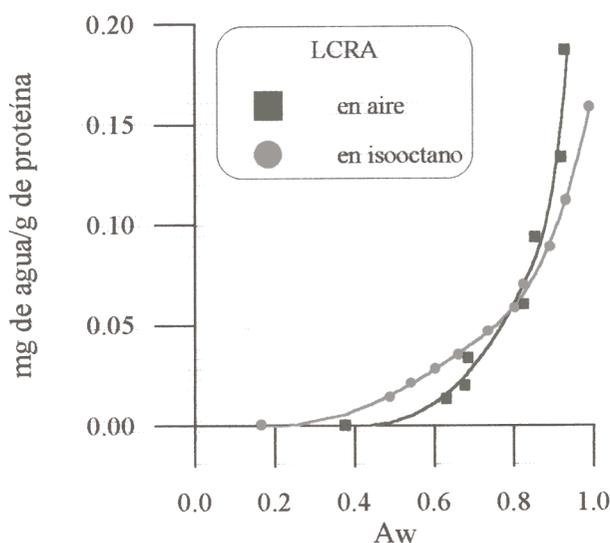


En este caso la isoterma de adsorción de la enzima sumergida en el disolvente se sitúa por debajo de la curva correspondiente al biocatalizador en aire a lo largo de todo el rango de a_w . Este hecho nos indica que para la misma cantidad de agua por gramo de muestra añadida se alcanza un mayor valor de a_w en presencia de isooctano que en aire. Ello se explica debido a que el

isooctano (disolvente hidrófobo) rechaza el agua añadida al medio y evita la hidratación de la proteína que se encuentra en su seno, por ello aumenta P_w y en consecuencia la a_w para la misma adición de agua. Este comportamiento es análogo al observado en el caso de la lipasa comercial (Figura IV.29).

A continuación se realizó el mismo análisis para las isoformas puras, LCRA y LCRB. De la misma manera, se estudió el perfil de las curvas cuando la preparación enzimática se encontraba en aire y en isooctano, siendo éste el mejor disolvente en el que estas lipasas catalizaban reacciones en medio orgánico y en consecuencia fue de primordial interés para nuestro grupo de trabajo estudiar el microentorno de las preparaciones cuando se encontraban en el seno de ese disolvente. En la Figura IV.35 se presenta las isoterms de sorción de agua de la LCRA en isooctano, junto con la correspondiente isoterma en aire.

Figura IV.35. Isoterma de sorción de agua de la LCRA en isooctano.



Podemos observar que debido al proceso de purificación el perfil de la isoterma se ha alterado. En este caso las dos curvas se cruzan en un punto con un valor de $a_w = 0,8$. Cuando se trabaja a valores de a_w superiores a 0,8, la curva correspondiente a la isoterma de adsorción de

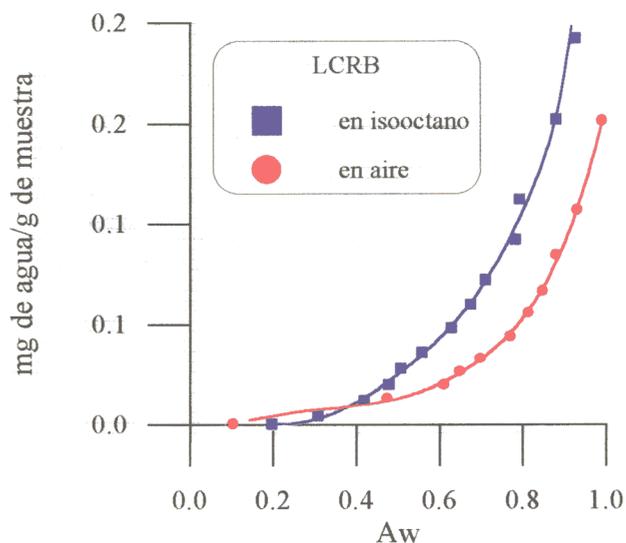
agua de la LCRA en aire transcurre por encima de la que representa al sistema formado por LCRA e isooctano. Por otro lado, trabajando con valores de a_w inferiores al que corresponde el punto de corte, es la isoterma de sorción del sistema la que avanza por encima de la curva del biocatalizador en aire. Esto es debido, como hemos explicado anteriormente, a la hidrofobicidad del disolvente empleado ($\log P = 5,18$) que, una vez que el contenido de agua añadido al sistema ha permitido rehidratarse al líquido, éste rechaza las nuevas adiciones hacia el biocatalizador, por eso la curva del sistema formado por LCRA y disolvente necesita menos agua para llegar al mismo valor de a_w que el biocatalizador en aire cuando se trabaja en el tramo de la isoterma donde a_w es mayor a 0,8. Por debajo de $a_w = 0,8$, ambos componentes, disolvente y enzima liofilizada sólida, adsorben agua y por ello, la isoterma de sorción del sistema va por encima de la adsorción de la enzima sólida.

En la Figura IV.36 aparece representadas las isotermas de sorción de agua en isooctano de la LCRB junto con la correspondiente isoterma de adsorción del biocatalizador en aire.

En este caso también se observa un punto de corte entre ambas curvas, como ocurría con la LCRA (Figura IV.35). Sin embargo, existe una notable diferencia y es que en este caso el valor de la a_w donde se cortan las dos curvas es de 0,4. Esta desigualdad está relacionada con la diferente hidrofobicidad de estas enzimas como hemos podido comprobar con el análisis realizado por otras técnicas de determinación del grado de hidratación (RMN y ATG/ATD). De esta manera, la LCRB al ser más hidrófoba que la LCRA, tiene un punto de corte a un valor de a_w inferior. Para valores de $a_w > 0,4$, es la isoterma de sorción LCRB/isooctano, la que va por encima de la de LCRB. Ello indica que el sistema necesita más agua para llegar al mismo valor de a_w que la LCRB. Esta situación es la opuesta a la observada para la LCRA y se relacionaría

con la mayor afinidad por el agua de la LCRA que la LCRB, tal y como vimos con las otras técnicas como RMN (IV.2.2.1) y ATG/ATD (IV.2.2.2).

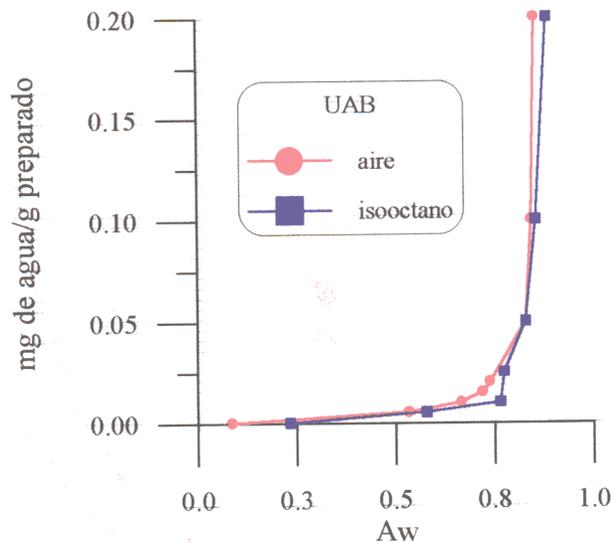
Figura IV.36. Isoterma de sorción de agua de LCRB en isooctano.



Los resultados obtenidos con la preparación UAB se pueden observar en la Figura IV.26.

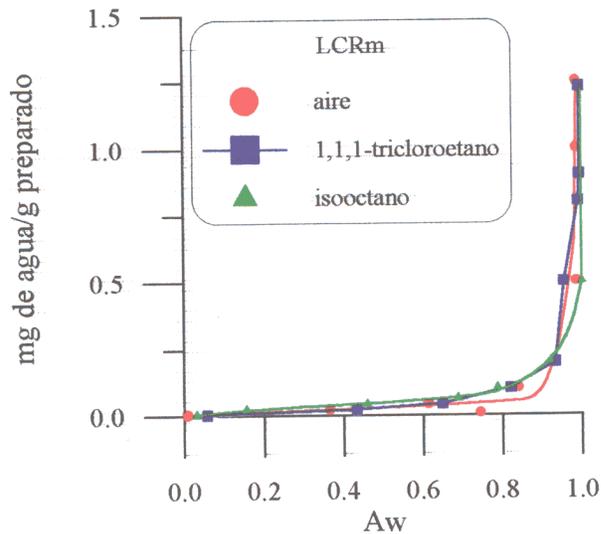
En este caso tanto la isoterma en aire como en isooctano transcurren casi simultáneamente hasta el punto de corte, que en este caso le corresponde un valor de a_w de aproximadamente 0,6. Esta diferencia con respecto al caso de la LCRC, cuyo valor de a_w para el punto de corte era 0,32, nos indica que esta preparación sólida presenta una naturaleza más hidrófoba que la preparación sólida comercial. Por lo tanto podemos afirmar que variando las condiciones de fermentación se puede obtener un preparado enzimático con una afinidad por el agua diferente.

Figura IV.37. Isoterma de sorción de agua de UAB en isooctano.

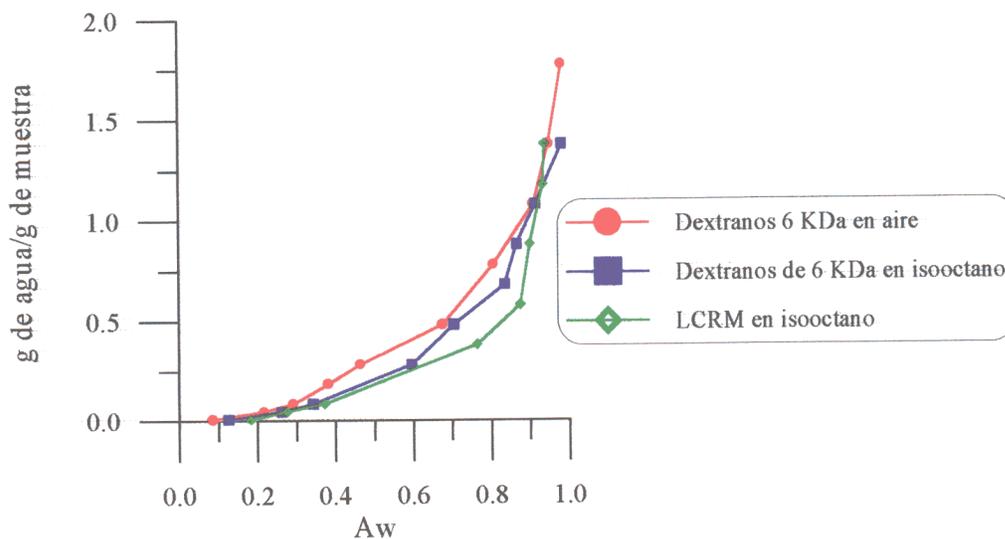


También se realizó el mismo análisis con una preparación de LCRS que se modificó con una unión no covalente con un dextrano de peso molecular de 10 Kda (LCRm). Para esta preparación fue de especial interés conocer cómo afectaba la presencia de un azúcar modificador sobre el microentorno de una preparación que se encontraba en el seno de un disolvente hidrófobo como el isooctano. Los resultados se muestran en la Figura IV.38 donde se representa la isoterma de adsorción de agua en aire de la preparación modificada no covalentemente (LCRm), junto con las isotermas de sorción de esta preparación cuando se encontraba en el seno de un disolvente hidrófobo, como el isooctano y cuando se mantuvo en presencia de un disolvente de características hidrofílicas como el 1,1,1-tricloroetano.

En este caso podemos comprobar que los perfiles de las correspondientes curvas transcurren simultáneamente. Ello se debe atribuir a que la mezcla sólida ha retenido mucho agua después de su liofilización debido a la presencia del dextrano; por ello, la hidratación de la superficie se alcanza con mucha facilidad en todos los casos.

Figura IV.38. Isoterma de sorción de agua de LCRm en isooctano.

Así mismo se realizó el mismo estudio en una muestra de dextranos utilizados para la modificación de la LCRS. En la Figura IV.39 se presenta la isoterma de adsorción de agua de una muestra de dextranos de 6 KDa de peso molecular, comparada con la isoterma de sorción de la misma pero en presencia de isooctano. Comprobamos que la presencia de un disolvente hidrófobo provoca un desplazamiento del perfil de la gráfica hacia valores superiores de a_w .

Figura IV.39. Isoterma de sorción de dextranos de 6 KDa en aire, en isooctano y de LCRM (procedente de LCRS modificada covalentemente con dextranos de 6 KDa).

Por otro lado, en la Figura IV.39 se representa el perfil de la isoterma de sorción de una muestra de LCRM, procedente de la modificación covalente de una preparación de LCRS con dextranos de 6 KDa de peso molecular. En este caso el perfil de la curva demuestra que esta preparación requiere una mayor cantidad de agua para llegar al estado de saturación, con respecto a la muestra procedente de la modificación no covalente (Figura IV.38). Esto indica que la LCRM presenta un menor carácter hidrofílico debido a que los azúcares empleados como modificadores están unidos covalentemente a la preparación enzimática y en consecuencia la disponibilidad de dextrano para captar moléculas de agua disminuye considerablemente.

3. REACCIONES.

3.1. Esterificación de ácidos (*R,S*) 2-arilpropanoicos.

1. Influencia del valor de a_w de preequilibrado inicial del sistema en la esterificación de ácidos (*R,S*) 2-aril propanoicos.

En la bibliografía se encuentran diversas referencias en las que se indica que una pequeña cantidad de agua es necesaria para que las enzimas liofilizadas sólidas actúen como catalizadores en reacciones en medios orgánicos.^{18,193,256} En concreto, en la reacción de esterificación, la cantidad inicial de agua presente en el sistema influye de manera importante en la actividad enzimática y en la distribución de productos. Por el contrario, en el caso de la transesterificación, el efecto del agua parece ser menos importante, especialmente en la enantioselectividad del proceso.

Es por ello por lo que hemos elegido la esterificación de los ácidos (*R,S*) 2-arilpropanoicos - de distinto tamaño e hidrofobicidad molecular- como reacción test (Esquema IV.1).

Tal y como se describió en la *Parte experimental* el biocatalizador y el disolvente se equilibraron por separado al mismo valor de a_w de preequilibrio. Esto nos aseguraba que este sería

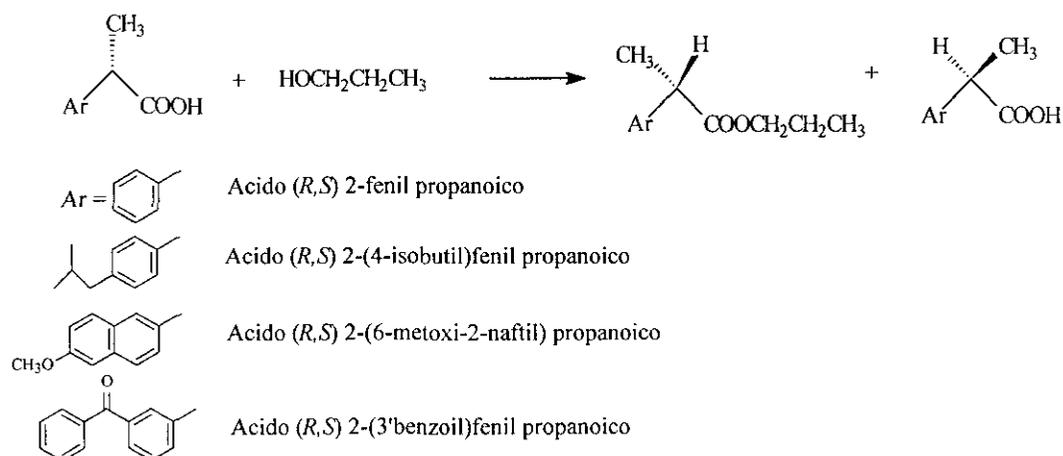
¹⁸ Goldberg, M., Thomas, D. y Legoy, M.D. (1990) *Eur. J. Biochem.*, **190**, 603-609.

¹⁹³ Halling, P. (1990) *Biochem. Biophys. Acta*, **1040**, 225-228.

²⁵⁶ Zarevúcka, M., Rejzek, M., Hoskovec, M., Svatos, A., Wimmer, Z., Kotek, B. y Legoy, M.D. (1997) *Biotechnol. Lett.*, **19**, 745-750

el valor de a_w de la muestra al inicio de la reacción. Esta alternativa de control de a_w en el medio de reacción ha sido igualmente utilizada por otros autores como Valivety y col.⁹⁸

Esquema IV.1. Esterificación de ácidos (*R,S*) 2-aril propanoicos.



En todos los casos la *S*-enantioselectividad permaneció inalterada tal y como se había afirmado con anterioridad.^{81,25}

Desde el punto de vista farmacológico y clínico, esta *S*-enantioselectividad es importante. La actividad antiinflamatoria del (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico (Ibuprofeno) está asociada al enantiómero-*S*. Sin embargo el ibuprofeno se administra clínicamente como racémico en base a que este enantiómero es enzimáticamente transformado *in vivo* en el *S*-enantiómero.²⁵⁷ No obstante, esto no está demostrado en todos y cada uno de los casos. Por ejemplo, sólo 2/3 del *R*-

⁹⁸ Valivety, R.; Halling, P.J.; Peilow, A. y Macrae, A. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1122**(2), 143-6.

⁸¹ de la Casa, R.M., Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1996) *Biotechnol. Lett.*, **18**, 13-18.

²⁵ Arroyo, M., Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1996) *Biotechnol. Lett.*, **17**, 525-530.

²⁵⁷ Wechter, W.J.; Loghead, D.G.; Reischer, R.J.; Van Giessen, G.J. y Kaiser, D.G. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 833-837.

enantiómero del (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico se invierten en S-enantiómero *in vivo*²⁵⁸ mientras que el *R*-enantiómero de algunos ácidos aril propanoicos como el caso del 2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico puede ser estereoselectivamente retenido en tejido adiposo.²⁵⁹ El uso del S-enantiómero permitiría la reducción de la dosis, ya que es 28 veces más potente que el (*R*)-2-(4-isobutilfenil) propanoico,²⁶⁰ permitiría una disminución de la toxicidad resultante de mecanismos no específicos de transformación hepática y eliminaría variaciones en la velocidad y extensión de la inversión provocadas por diferencias en la respuesta terapéutica.²⁶¹ De ahí que la obtención del enantiómero *S* puro a partir de racematos de los ácidos (*R,S*) aril propanoicos ópticamente activos sea de gran utilidad farmacológica.

En la Tabla IV.22 se muestran los resultados obtenidos en la esterificación del ácido (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico con n-propanol empleando diferentes disolventes, a distintos valores de a_w , comprendidos entre 0 y 1 aproximadamente.

Puede comprobarse que a medida que el disolvente, que es el componente mayoritario del sistema, se hace más hidrófilo, la máxima conversión se alcanza a un mayor valor de a_w de preequilibrio; observándose que no hay reacción cuando se utilizó como disolvente la isobutil metil cetona debido a su alta hidrofilia. Esto se explica por la restricción difusional que ejerce el disolvente al paso del ácido lípido ($\pi = 4,29$)²³⁷ hacia el centro activo de la enzima, ya que

²⁵⁸ Kaiser, D.G.; Van Giessen, G.J.; Riescher, R.J. y Wechter, W.J. (1976) *J. Pharm. Sci.*, **65**, 269-273.

²⁵⁹ Lee, E.J.D.; Williams, K.M.; Graham, G.G.; Day, R.O. y Cahmpion, G.D. (1984) *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1542-1544.

²⁶⁰ Tai, D.F.; Chao, Y.H.; Huang, C.Y.; Wo, J.M.; Lin, Y.T.; Wu, S.A. (1995) *J. Chim. Chem. Soc.*, **5**, 801-807.

²⁶¹ Hutt, A.J. y Caldwell, J. (1983) *J. Pharm. Pharmacol.*, **35**, 693-704.

²³⁷ Hansch, C.; Leo, A. y Hoekman, D. (1995) *Exploring QSAR. Hydrophobic, Electronic and Steric Constants*. American Chemical Society, Washington, DC.

cuanto más hidrófilo sea el disolvente peor se difunde el sustrato a través del medio. Esto se aprecia incluso en ausencia prácticamente de agua, $a_w = 0$.

Tabla IV.22. Resultados obtenidos en la esterificación con n-propanol del ácido (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico con n-propanol. $t = 100$ h. Condiciones: [ácido] = [alcohol] = 66 mM, 200 mg LCRC, $T^a = 30$ °C, 500 rpm, $V_f = 10$ ml.

Disolvente	a_w	% C	e.e. sustrato (R>S)	e.e. producto (S>R)
Isooctano	0,3	61	84	54
	0,5	54	>98	84
	0,7	47	82	92
	1,0	42	5,2	7,1
Ciclohexano	0,0	16	13	68
	0,45	15	8,7	49
	0,7	59	87	60
	1,0	50	73	73
1,1,1-tricloroetano	0,0	2,3	0,57	24
	0,45	3,8	5,4	100
	0,7	7	2,1	30
	1,0	29	36	88
éter diisopropílico	0,0	0,57	3,2	100
	0,45	0,44	2,81	100
	0,7	0,85	2,3	100
	1,0	4,00	3,3	100

Así mismo, cuanto más hidrófilo es el disolvente mayor es la cantidad de agua que se ha

de añadir para evitar que la enzima sea deshidratada, y menos esterificación se observa al estar favorecida la hidrólisis del ester formado.

Así podemos comprobar que en el caso de la esterificación en presencia de isooctano ($\log P = 5,18$) el mayor porcentaje de conversión (61 %) se obtiene con un valor de a_w de 0,3; en cambio cuando la síntesis transcurre en ciclohexano ($\log P = 3,44$) es con una a_w de 0,7 donde se alcanza la mayor conversión (59 %). Finalmente, cuando se utilizan disolventes más hidrófilos como el 1,1,1-tricloroetano ($\log P = 2,49$) y el éter diisopropílico ($\log P = 1,52$) el porcentaje de conversión disminuye considerablemente. No obstante los mejores valores se obtienen cuando el sistema se equilibra a una $a_w \approx 1,0$.

Respecto a los datos de exceso enantiomérico, en todos los casos se produce la esterificación del ácido *S*, como cabía esperar de la enantioselectividad predicha para la enzima.

Esta misma *S*-enantioselectividad se encontró en la hidrólisis catalizada por la lipasa de *Candida rugosa* empleando el ester del metanol¹⁹⁰ y cloro etanol.²⁶² Al igual que en la esterificación del (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico en microemulsiones AOT/isooctano catalizada por la lipasa de *Candida rugosa* comercial.^{121,263}

De cualquier modo estos resultados coinciden con los obtenidos por Mustranta¹⁹⁹ en la esterificación de (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico catalizada por la lipasa de *Candida*

¹⁹⁰ Hernáiz, M.J.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1994) *Tetrahedron*, **50**, 10749-10760.

²⁶² García, M.; Gradillas, A.; Del Campo, C.; Llama, E.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V: (1997) *Biotechnol. Lett.*, **19**(10), 999-1004.

¹²¹ Hedström, G.; Backlund, M. y Slotte, J.P. (1993) *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 618-624.

²⁶³ Goto, M.; Noda, S.; Kamiya, N.; Nakashio, F. (1996) **18**(7), 839-844.

¹⁹⁹ Mustranta, A. (1992) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 61-66.

cylindracea, obteniendo los mejores resultados en disolventes hidrófobos y una marcada enantioespecificidad para el (*S*)-2-(4-isobutilfenil) propanoico sobre todo cuando se empleaban alcoholes primarios.

De los datos de la Tabla IV.22 deducimos que no hay una relación clara entre las propiedades del disolvente y/o a_w de preequilibrio y el exceso enantiomérico del ester formado. En general, los valores de a_w en los que se obtiene un mejor valor de exceso enantiomérico del producto y exceso enantiomérico del sustrato, son mayores para el disolvente más hidrófilo que para el hidrófobo (isooctano), existiendo un valor óptimo. Resultados similares han sido descritos por Ducret y col.¹⁴ para la lipasa B de *Candida antarctica* y este sustrato, empleando hexano y heptano como disolventes, así como Cernia y col.²⁶⁴ con otras hidrolasas.

Por último, si analizamos los resultados obtenidos en la Tabla IV.22 a la luz de las isotermas de sorción de la enzima en los distintos disolventes: isooctano (Figura IV.27); ciclohexano (Figura IV.28); 1,1,1-tricloroetano (Figura IV.29) y éter diisopropílico (Figura IV.30) podemos explicar el papel de a_w de preequilibrado en la conversión.

Los catalizadores sólidos sólo muestran una buena actividad ester sintetasa si se los ha preequilibrado a una a_w mayor al punto de corte de las isotermas de adsorción y sorción: 0,3 (isooctano), 0,65 (ciclohexano) y 0,6 (1,1,1-tricloroetano). Las bajas conversiones obtenidas en el caso del éter diisopropílico no permiten obtener conclusiones con este disolvente. Ello se debe a que, como se explicó en su momento, a partir de este punto, se ha alcanzado la suficiente hidratación de la superficie del catalizador como para dar la reacción de esterificación, pudiendo

¹⁴ Ducret, A.; Trani, M. y Lortie, R. (1998) *Enzyme Microb. Technol.*, **22**, 212-216.

²⁶⁴ Cernia, E.; Palocci, C. y Soro, S. (1998) *Chemistry & Physics of Lipids*, **93**, 157-168.

concluir que estaríamos en una situación similar a la presentada en la Figura I.1.³⁸

A continuación en la Tabla IV.23 se muestran los valores de conversión y exceso enantiomérico a las 100 h obtenidos en la esterificación del ácido (*R,S*) 2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico con n-propanol. Como ocurría en el caso del (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico (Tabla IV.22), no hubo esterificación en el caso de emplear como disolvente la isobutil metil cetona, debido a que dada su hidrofilia competía con el biocatalizador por las moléculas de agua y provocaba la pérdida de la configuración catalíticamente activa de la proteína.

Las conversiones obtenidas son inferiores respecto a la esterificación del (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico debido al impedimento estérico provocado por el gran tamaño del sustituyente aromático que da lugar a restricciones en la interacción con el centro activo de la lipasa.²⁶⁵ Este efecto estérico también se observó en la hidrólisis del ester etílico del (*R,S*) 2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico respecto al ester etílico del (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico, cuando se empleaba la lipasa de *Candida rugosa* como catalizador.¹⁹⁰ Por otro lado, las propiedades lipídicas del sustrato también influyeron en la disminución de la especificidad enzimática.⁸¹

³⁸ Stenning, R.A.; Needs, E.C.; Brooker, B.E. y Vulfson, E.N. (1993) *Biotechnology*, **11**, 1294-1301.

²⁶⁵ Holmquist, (1998) *Chemistry & Physics of Lipids*, **93**, 57-65.

¹⁹⁰ Hernáiz, M.J.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1994) *Tetrahedron*, **50**, 10749-10760.

⁸¹ De la Casa, R.M., Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1996) *Biotechnol. Lett.*, **18**, 13-18.

Tabla IV.23. Resultados obtenidos en la esterificación del ácido (R, S) 2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico con n-propanol (t = 100 h). Condiciones de reacción: [ácido] = [alcohol] = 66 mM, 20 0 mg de LCRC, T^a = 30 °C, 500 rpm, V_f = 10ml.

Disolvente	a _w	% C	% e.e. sustrato	% e.e. producto
Isooctano	0,0	3,6	10	79
	0,3	9	2	79
	0,5	3,6	12	100
	0,7	4	4,5	100
	1,0	12	3,5	100
Ciclohexano	0,0	3,8	7	100
	0,45	3,7	4,5	100
	0,7	4,5	2,5	100
	1	12,5	2,5	100
1,1,1-tricloroetano	0,0	2,6	1,7	19
	0,3	3,5	5,2	29
	0,5	7,8	3,4	40
	0,7	6,3	2,1	31
	1,0	5,0	20	31
Eter diisopropílico	0,0	4,4	2,8	60
	0,3	3,9	0,8	19
	0,5	5,6	0,73	12
	1,0	5,9	2,4	38

Podemos comprobar que en este caso al tratarse de un sustrato menos lipófilo ($\pi = 3,08$)²³⁷ que el anterior, se necesita un medio más hidrófilo para alcanzar mejores conversiones. Esta característica queda confirmada al observar que en el caso del isooctano y del ciclohexano, los mejores valores de conversión se alcanzan con una $a_w \approx 1,0$, es decir cuando el sistema está saturado en agua. Mientras que en el caso del 1,1,1-tricloroetano, que es menos hidrófobo, la máxima conversión se alcanza a un valor de a_w de preequilibrio de 0,5. Por último, observamos que en el caso del éter diisopropílico, al ser más hidrofílico, el medio de reacción requiere mayor cantidad de agua para que la enzima mantenga su conformación activa y sea capaz de competir por las moléculas de agua con el disolvente, por eso, las mejores conversiones se alcanzan con altos valores de a_w , aunque en este caso las conversiones son significativamente bajas.

Respecto a los excesos enantioméricos podemos decir que la enzima fue enantioselectiva en la esterificación del isómero *S*(+) del ácido.

Los resultados coinciden con los obtenidos por Tsai y Wei²⁶⁶ en la esterificación enantioselectiva del (*R,S*) 2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico con la lipasa de *Candida cylindracea* en isooctano. Estos autores confirman la *S*-enantioselectividad de la enzima, siendo ésta máxima cuando emplean el trimetilsililmetanol como nucleófilo y una temperatura de 65 °C. Chang y Tsai²⁶⁷ también ensayaron la esterificación catalizada por la lipasa de *Candida rugosa* empleando 4-morfolinoetanol como nucleófilo en isooctano obteniendo la misma enantioselectividad.

La *S*-enantioselectividad de la enzima también se observó en la hidrólisis del ester

²³⁷ Hansch, C.; Leo, A. y Hoekman, D. (1995) *Exploring QSAR. Hydrophobic, Electronic and Steric Constants*. American Chemical Society, Washington, DC.

²⁶⁶ Tsai, S.-W. y Wei, H.-J. (1994) *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 64-68.

²⁶⁷ Chang, Ch.-Sh.; Tsai, Sh.-W. (1997) *Enzyme Microb. Technol.*, **20**, 635-639.

metílico del (*R,S*) 2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico catalizada por la lipasa de *Candida rugosa*^{190,268} y del ester del cloro etanol.²⁶²

Dadas las menores conversiones obtenidas, el relacionar la conversión con a_w es más difícil en este caso. No obstante, sí que se observa este efecto en el caso del isooctano ($a_w > 0,3$) y ciclohexano ($a_w > 0,7$). Sin embargo, en este caso el máximo de actividad se desplaza a un valor superior de a_w dada la mayor hidrofilia de este ácido comparado con el anterior.

En la Tabla IV.24 pueden apreciarse los resultados obtenidos en la resolución del ácido (*R,S*) 2-fenil propanoico con n-propanol con todos los disolventes empleados y con diferente a_w de preequilibrio. Este sustrato fue el que tomamos como referencia de lipofilia ($\pi = 1,18$)²³⁷ debiéndose considerar el más hidrófilo.

La resolución enzimática del ácido (*R,S*) 2-fenilpropanoico ha sido realizada previamente tanto vía hidrólisis del ester metílico¹⁹⁰ y del ester del cloro etílico.²⁶²

Se observa que las conversiones son muy inferiores a las obtenidas en la esterificación de (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico pero mayores que las obtenidas con el anterior ácido.

Como ocurría en los otros casos, 1,1,1-tricloroetano y éter diisopropílico tienen bajas conversiones dada su elevada hidrofilia. En el caso de los disolventes más hidrófobos, se ve que las mayores conversiones se obtienen a $a_w > 0,3$ (isooctano) y $a_w > 0,65$ (ciclohexano), como en los casos anteriores. Esto nos vuelve a poner de manifiesto la estrecha relación que existe entre

¹⁹⁰ Hernáiz, M.J.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1994) *Tetrahedron*, **50**, 10749-10760.

²⁶⁸ Botta, M.; Cernia, E.; Corelli, F.; Manetti, F. y Soro, S. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1337**, 302-310.

²⁶² García, M.; Gradillas, A.; Del Campo, C.; Llama, E.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V: (1997) *Biotecnol. Lett.*, **19(10)**, 999-1004.

²³⁷ Hansch, C.; Leo, A. y Hoekman, D. (1995) *Exploring QSAR. Hydrophobic, Electronic and Steric Constants*. American Chemical Society, Washington, DC.

disolvente y a_w a la hora de optimar un proceso de esterificación.

Tabla IV.24. Resultados obtenidos en la esterificación del ácido (*R,S*) 2-fenil propanoico con n-propanol ($t = 100$ h). Condiciones de reacción $[\text{ácido}] = [\text{alcohol}] = 66$ mM, 200 mg de preparado LCRC, $T^a = 30$ °C, agitación 500 rpm, volumen = 10 ml.

Disolvente	a_w	% c	% e.e. _{sustrato}	% e.e. _{producto}
Isooctano	0,0	3,0	2,1	67
	0,3	15	16	90,5
	0,5	20	22	100
	0,7	36	25	86
	1,0	27	18	51
Ciclohexano	0,0	3,5	1	100
	0,4	8,4	8,6	84
	0,7	21	18	67
	1,0	28	20	30
1,1,1-tricloroetano	0	3	0,2	6,4
	0,3	2,2	0,9	40
	0,5	6,1	6,0	92
	0,7	7,3	3,5	91
	1	10,5	14	100
Eter diisopropílico	0	0,8	53	9,5
	0,3	1,4	35	25
	0,5	0,81	86	100
	0,7	3,1	3,2	100
	1	3,8	6,9	100

Respecto a los valores de los excesos enantioméricos solamente comentar que la enzima ha mantenido su enantioselectividad hacia la esterificación del ácido *S*(+). La *S*-enantioselectividad ya fue definida en la hidrólisis de diferentes esteres del ácido (*R,S*)-2-fenil propanoico catalizada por la lipasa de *Candida cylindracea* inmovilizada covalentemente.²⁶⁹

De todo lo dicho puede deducirse que el valor de π del sustrato y el valor del log P del disolvente son los parámetros que parecen determinar el comportamiento del sistema. Sin embargo, no existe una clara correlación entre los valores de la máxima conversión y los excesos enantioméricos.

El hecho de la ausencia de reacción cuando se empleó la isobutil metil cetona como medio de la reacción, a parte de ser debido a la alta hidrofilia de este disolvente, también se puede justificar a partir de la isoterma de sorción de agua de LCRC en isobutil metil cetona (ver Figura IV.30). Cuando este disolvente se emplea como medio orgánico de reacción, representa el componente mayoritario del sistema y en consecuencia absorbe todo el agua que lleva en su caso el biocatalizador, produciendo la deshidratación del mismo y posterior desactivación. Además la eliminación del agua del biocatalizador por disolventes hidrófilos es prácticamente instantánea ($t < 5$ min) comparando con las condiciones de reacción ($t = 100$ h), tal y como han demostrado Gorman y Dordick⁴⁸ utilizando T_2O absorbido sobre el biocatalizador y disolventes hidrofílicos secos. Por otro lado, dada la elevada solubilidad del agua en este disolvente, se favorece la hidrólisis frente a la síntesis en el caso de que se añadiera la cantidad de agua necesaria para poder hidratar al biocatalizador cuando está en presencia de este disolvente.

²⁶⁹ Moreno, J.M. y Sinisterra, J.V. (1995) *J. of Mol. Catal. A: Chemical*, **98**, 171-184.

⁴⁸ Gorman, L. y Dordick, J. (1992) *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 392.

Estos resultados vienen a confirmar lo expuesto por Zaks y Klivanov⁴⁶ respecto al aumento de la actividad catalítica de las enzimas al aumentar el contenido en agua del disolvente empleado como medio de reacción. Ya que estos autores afirman que la cantidad de agua requerida para la catálisis con una enzima varía de un disolvente a otro, aunque en su trabajo no utilizan el concepto de a_w , coinciden con nuestros resultados al exponer que en disolventes hidrófobos las enzimas requieren menos cantidad de agua que cuando actúan en disolventes hidrofílicos. Aunque en todos los disolventes estudiados, la enzima capta moléculas de agua del medio, es la hidrofobicidad del disolvente el parámetro que determina que para un mismo contenido en agua presente en el medio, la cantidad de agua que consigue captar la enzima varía de un disolvente a otro.

Por otro lado, comprobamos que el poder catalítico de la lipasa de *Candida rugosa* para cada sustrato puede ser controlado cambiando el disolvente óptimo para cada caso. Wescott y Klivanov³⁵ atribuyen este efecto a que según el medio empleado, la unión de las moléculas de disolvente a la enzima serán sustituidas con más facilidad por una unión más fuerte de la enzima con el sustrato así como a la energía de interacción entre enzima y sustrato.

Igualmente Bodnár y col²⁷⁰ también comprobaron en la esterificación enantioselectiva de ácidos 2-cloro propanoicos catalizada por la lipasa de *Candida rugosa* en diferentes disolventes que la reactividad del biocatalizador depende de la naturaleza del disolvente y de la distribución de agua entre la enzima y el medio orgánico, considerando que para el biocatalizador es necesaria

⁴⁶ Zaks, A. y Klivanov, A.M. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 8017-8021.

³⁵ Wescott, C.R: y Klivanov, A.M. (1993) *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 1629-31.

²⁷⁰ Bodnár, J.; Gubicza, L. y Szabó, L.-P. (1990) *J. Mol. Catal.*, **61**, 353-361.

cierta cantidad de agua para su conformación catalíticamente activa.

Otra conclusión que se deduce de nuestros resultados es que no puede generalizarse disolvente óptimo, ni el valor de a_w de preequilibrio, ni tan siquiera para sustratos de la misma familia como son el ácido fenil propanoico, (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico y (*R,S*) 2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico.

En función de estos resultados podemos decir que el análisis del grado de hidratación de un sistema a través de las isothermas de sorción de agua nos indicará si la reacción de esterificación puede o no tener lugar. Si la isoterma de absorción de agua del disolvente está muy desplazada a la izquierda respecto a las isothermas del biocatalizador en aire y del biocatalizador humedecido en el disolvente, la reacción no tiene lugar, pues el biocatalizador es deshidratado por el disolvente o bien éste aporta agua al sistema, favoreciendo termodinámicamente la reacción de hidrólisis frente a la de esterificación. La reacción tiene lugar a valores de a_w de preequilibrio por encima del punto de corte de las isothermas de sorción y adsorción de la enzima.

Tal y como hemos demostrado en la Sección IV.2.3 (apartado 3) las isothermas de sorción de agua del disolvente y del biocatalizador por separado, no representan al sistema formado por ambos componentes. Por esta razón los experimentos se han realizado preequilibrando catalizador y disolvente por separado al mismo valor de a_w y mezclándolos. Puede considerarse que es este el valor de a_w de la mezcla al iniciarse la reacción, pero su valor varía a lo largo del proceso de esterificación. Esta va recubriendo el catalizador al producirse agua tal y como lo han puesto de manifiesto Vulfson y col.²⁷¹ empleando diferentes colorantes y medidas de polarografía. Así podemos pensar que la reacción se inicia a un valor de a_w inicial válido para un $t = 0$ para el

²⁷¹ Vulfson, E.N. (1993) *Trends in Food Science & Technology*, **4**, 209.

biocatalizador, microentorno (interfase) y macroentorno (disolvente) y que a medida que transcurre la reacción se desplazaría hacia valores mayores de a_w , alcanzándose al final valores de $a_w \approx 1$ en el microentorno del biocatalizador sólido.

No obstante, dadas las concentraciones equimoleculares de reactivos empleadas (66 mM), la máxima cantidad de agua que se puede obtener, supuesto el 100 % de conversión sería de 11,9 mg y teniendo en cuenta el volumen del disolvente (10 ml), correspondería a 1,19 mg de agua/ml de disolvente. Teniendo en cuenta que la conversión máxima obtenida al cabo de 100 h prácticamente no ha superado el 50 %, tenemos que la cantidad de agua producida se debe estimar alrededor de 0,59 mg/ml de disolvente, cantidad despreciable con la añadida en el preequilibrado de las muestras. Por ello, podemos decir en principio, que el efecto del curso de la reacción sobre la variación de a_w es despreciable en nuestro caso.

Así pues podemos suponer que son disolvente y biocatalizador los que se reequilibran muy lentamente distribuyendo todo el agua del sistema, aportada por ambos, en toda la masa del sistema, formada por disolvente y biocatalizador, incluidas las moléculas de sustrato que se solvatan en función de su lipofilia.

Según esto, podemos concluir que si se quieren óptimas conversiones de esterificación se debe trabajar a a_w de preequilibrio mayores que los valores de a_w donde se produce el corte entre la isoterma de sorción de agua del biocatalizador humedecido en el disolvente y la isoterma de adsorción del biocatalizador en aire.

Seguidamente se continuó el estudio con el resto de las preparaciones enzimáticas. Dado que teníamos prefijado la cantidad de agua necesaria para llegar a un determinado valor de a_w a partir de las isotermas de sorción de agua del biocatalizador embebido en un disolvente orgánico

procedimos al estudio de la actividad catalítica en una reacción de síntesis de las preparaciones estudiadas. Para ello, se empleó la reacción de esterificación de (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico con n-propanol como reacción test, ya que fue en estas condiciones donde se obtuvieron los mejores resultados en conversión. Como disolvente se escogió el isooctano, que había sido ensayado en esta Memoria y que además estaba avalado por la bibliografía como un buen disolvente en la esterificación catalizada por la lipasa de *Candida rugosa*.^{81,199} De esta manera podíamos comparar los preparados en condiciones de síntesis y estudiar la influencia del grado de hidratación en su actividad y enantioselectividad.

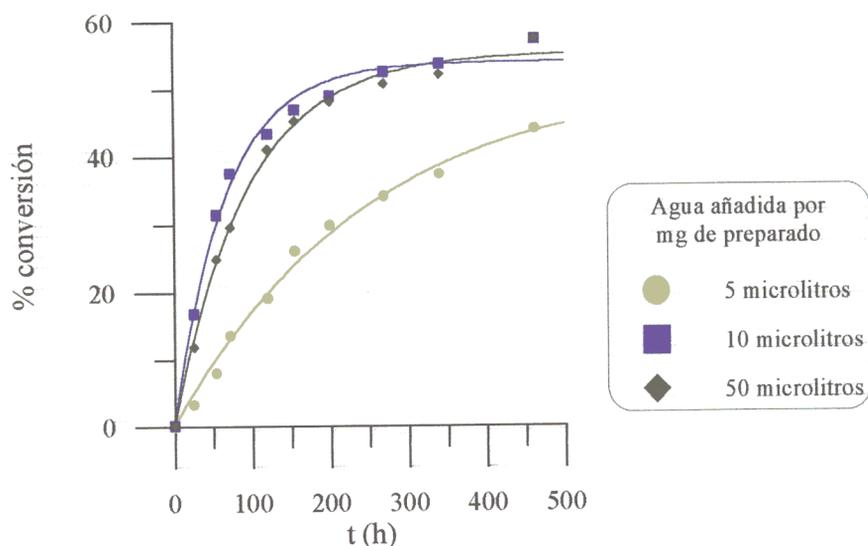
En la Figura IV.40 se muestran las curvas de progreso correspondientes a la esterificación de (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico con n-propanol en isooctano empleando como catalizador el preparado semipurificado procedente de la preparación comercial y denominado a lo largo de esta Memoria como LCRS.

La reacción se llevó a cabo en tres grados de hidratación diferentes, que fueron 5, 10 y 50 μl de agua/mg de preparado, con ello se trabajaría a diferentes valores de a_w según lo muestra el perfil de la isoterma de sorción de agua de este preparado en la Figura IV.34. Dado que el volumen final de la reacción es de 10 ml con 5 μl de agua/mg de preparado, trabajaríamos en un valor aproximado de $a_w = 0,8$, correspondiente al primer tramo ascendente de la isoterma. Con 10 μl de agua/mg de preparado, el valor de $a_w = 0,9$, que corresponde a un tramo de la curva donde se inicia el proceso de saturación y finalmente con 50 μl de agua/mg de preparado, se trabajaría en condiciones cercanas a la saturación en agua, con un valor de $a_w \approx 1,0$.

⁸¹ De la Casa, R.M., Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1996) *Biotechnol. Lett.*, **18**, 13-18.

¹⁹⁹ Mustranta, A. (1992) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 61-66.

Figura IV.40. Conversión en ester propiónico del (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico catalizada por LCRS. Condiciones de reacción [ácido] = [alcohol] = 66 mM, 40 mg de preparado LCRS, $T^{\circ} = 30^{\circ}\text{C}$, agitación 500 rpm, volumen = 10 ml.



Observamos que el porcentaje de conversión cuando se añaden 5 mg de agua/mg de preparado enzimático es inferior a los perfiles correspondientes a los otros dos casos, debido a que este contenido en agua aunque es suficiente para hidratar el preparado enzimático, hay que tener en cuenta que nos encontramos en un volumen de reacción de 10 ml, por lo que el agua añadida debe repartirse entre todo el sistema. Transcurridas más de 450 h de reacción no se alcanza el 50 % de conversión. Al emplear 10 mg de agua/mg de preparado, la adición es suficiente para hidratar al biocatalizador y repartirse entre todo el sistema. La velocidad inicial es mayor y se alcanza el 50 % de conversión a 200 h, aunque la velocidad de la reacción varíe poco tras alcanzar este rendimiento. Añadiendo 50 mg de agua/mg de preparado, la velocidad inicial es ligeramente inferior, aunque también se alcance el 50 % de conversión a 200 h, siguiendo un comportamiento semejante al perfil presentado por la adición de 10 mg de agua/mg de preparado. Además también se realizó un estudio de la enantioselectividad del sistema analizando las muestras por HPLC tal y como se explicó en la *Parte experimental*.

Tabla IV.25. Datos de conversión (%) en ester propiónico del (*R,S*)-2-(-isobutilfenil)propanoico catalizada por LCRC. Condiciones de reacción: [ácido]=[éster]=66mM; volumen final: 10 ml; preparado enzimático: 40 mg; disolvente: isooctano; 30°C; 500 rpm; agua bidestilada: 5, 10 y 50 µl por mg de preparado enzimático. ^a Conversión en ester. ^b Exceso enantiomérico de ácido remanente R (-) > S (+) calculado por HPLC.

t(h)	5 µl agua/mg prep.		10 µl agua/ mg prep.		50 µl agua/mg prep.	
	% conv. ^a	% e.e. ^b	% conv. ^a	% e.e. ^b	% conv. ^a	% e.e. ^b
25	3,2	9,5	17	15,5	12	13
54	8	13	31	37	25	26
72	13	17	37	50	30	32,5
120	19	24,5	43	50,1	41	51
155	26	29	47	60	45	56,5
200	30	33	49	62	48	64,5
269	34	39,5	52,5	66	51	70
340	37	43	54	67	52	70,5
462	44	46	57	69	57	71

Los resultados se muestran en la Tabla IV.25, donde podemos observar que el derivado semipurificado mantiene la enantioselectividad hacia la esterificación del ácido *S* (+). Los excesos enantioméricos del ácido remanente aumentan a medida que avanza la conversión. No obstante, los valores obtenidos son algo menores que los alcanzados para LCRC a tiempo semejante (Tabla IV.22), obteniéndose en todos los casos valores muy bajos de la relación enantiomérica (*E*)¹⁹⁶ ($2 < E < 50$). Esta menor actividad de la LCRC respecto a la LCRC en procesos de esterificación ya fue indicada por Sánchez-Montero y col.¹⁸⁹ y atribuida por los autores a la desestabilización producida por la eliminación de la lactosa. No obstante, a la luz de

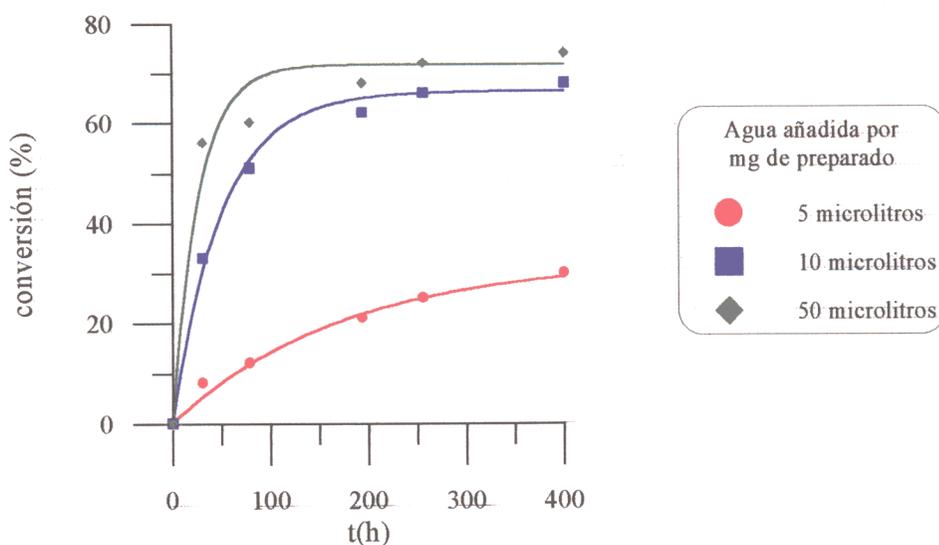
¹⁹⁶ Sih, C.J. y Wu, S.H. (1989). En *Topics in Stereochemistry*, 19. Ed.: Eliel, E.L. y Wilen, S.H., NY:John Wiley & Sons. pág.: 63-125.

¹⁸⁹ Sánchez-Montero, J.M.; Hamon, V.; Thomas, D. y Legoy, M.D. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, 1078, 341-350.

nuestros resultados de ATG (Tabla IV.20), donde se mostraba que la LCRS estaba más hidratada que la LCRC, no debemos descartar cierta lixiviación del agua intraparticular hacia la superficie favoreciendo la hidrólisis frente a la síntesis.

El mismo ensayo fue realizado para la preparación UAB obtenida a través de condiciones de fermentación controladas. Igualmente se escogieron tres estados de hidratación diferentes para conocer cómo afectaba el grado de hidratación en la actividad catalítica y en la enantioselectividad del preparado (Figura IV.41). Las condiciones de reacción consistieron en la esterificación del ácido (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propiónico con n-propanol en isooctano a 30 °C. Los excesos enantioméricos alcanzados y la conversión alcanzada se muestra en la Tabla IV.26.

Figura IV.41. Conversión en ester propiónico del (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico catalizada por UAB. Condiciones de reacción: [ácido] = [alcohol] = 66mM; volumen final: 10 ml; preparado enzimático: 227 mg; disolvente: isooctano; T^a: 30°C; agitación: 500 rpm.



La lipasa UAB mantuvo la *S*-enantiopreferencia, mostrando una sensibilidad al grado de hidratación comparable a la observada con los anteriores preparados. El preparado UAB mostró también una baja enantioselectividad pues los valores de *E* nunca superan el valor de 10,0.

Tabla IV.26. Datos de conversión (%) en ester propiónico del (*R,S*) 2-(-isobutilfenil) propanoico catalizada por UAB. Condiciones de reacción: Condiciones de reacción: [ácido] = [alcohol] = 66mM; volumen final: 10 ml; preparado enzimático: 227 mg; disolvente: isooctano; T^a: 30°C; agitación: 500 rpm; agua bidestilada: 5, 10 y 50 µl por mg de preparado enzimático.

t(h)	5 µl agua/mg prep.		10 µl agua/mg prep.		50 µl agua/mg prep.	
	% conv. ^a	% e.e. ^b	% conv. ^a	% e.e. ^b	% conv. ^a	% e.e. ^b
30	8	13,5	33,5	44,5	56	79
80	12	17	51	70,5	60	76,5
200	21	21,5	62	82,5	68	73
250	25	20,5	66,5	79	72	66
400	30	24	71,5	74	78	22

^a Conversión en ester. ^b Exceso enantiomérico de ácido remanente R (-) > S (+) calculado por HPLC.

En función de estos resultados obtenidos se determinaron las velocidades iniciales de la esterificación catalizada por cada preparado cuando actuaban como catalizadores de la reacción utilizada como test para determinar la influencia del grado de hidratación sobre la actividad sintética en medio orgánico. Los resultados son las que se muestran en la Tabla IV.27, donde se comparan con los datos obtenidos para LCRC en las mismas condiciones de reacción.

Tabla IV.27. Velocidades iniciales de reacción para la síntesis del ester propiónico del (*R,S*) 2-(-isobutilfenil) propanoico. Condiciones de reacción: [ácido] = [alcohol] = 66mM; volumen final: 10 ml; preparado enzimático: 40 mg; disolvente: isooctano; T^a: 30°C; agitación: 500 rpm; agua bidestilada: 5, 10 y 50 µl por mg de preparado enzimático.

Enzimas	Velocidad inicial (mmol ester convertidos/mg enzima/h)			V _{o(50)} /V _{o(S)}
	5 µl agua/mg prep.	10 µl agua/mg prep.	50 µl agua/mg prep.	
LCRC	1,83·10 ⁻³	3,15·10 ⁻³	6,61·10 ⁻³	3,6
LCRS	1,32·10 ⁻³	3,4·10 ⁻³	9,67·10 ⁻³	7,32
UAB	1,25·10 ⁻³	8,82·10 ⁻³	22·10 ⁻³	17,6

Puede apreciarse que añadiendo 5 µl agua/mg de enzima hay una baja velocidad de reacción debido a que la hidratación no es suficiente para que el preparado enzimático pueda

ejercer su actividad catalítica con el mismo rendimiento, esto es más patente en el caso de UAB.

Si se aumenta hasta 10 µl agua/mg de preparado, la velocidad de la LCRS es algo superior a la de LCRC. En este caso la UAB ha aumentado bastante la velocidad con respecto a los otros dos biocatalizadores.

Este hecho es más notable cuando se añaden 50 µl agua/mg de enzima, donde la velocidad para la reacción catalizada por LCRS es mayor que LCRC, aunque la actividad de UAB está muy por delante de ambas, trabajando frente al mismo sustrato y con las mismas condiciones de reacción.

En resumen, a baja cantidad de agua añadida por mg de muestra con ambos catalizadores (LCRS y UAB) se tiene una misma velocidad inicial de esterificación. No obstante, al aumentar la cantidad de agua añadida, las velocidades iniciales de esterificación obtenidas con la LCRS y UAB son mayores que con el preparado comercial. Esto indica una mayor sensibilidad al nivel de hidratación del macro y microentorno de las lipasas UAB y LCRS que en el caso de la LCRC. Ello está de acuerdo con sus isotermas de sorción, Figura IV.34 y Figura IV.35, respectivamente, comparadas con la de LCRC (Figura IV.29).

Estos resultados también coinciden con los presentados por Sih y col.¹⁹⁷ en la hidrólisis de 2-aril y 2-ariloxipropanoicos catalizada por preparaciones cruda y purificadas de una lipasa usando medio orgánico como disolvente. Comprobaron un aumento de k_{cat}/K_m al emplear la preparación purificada que procedía de una modificación no covalente. Un efecto similar estaría provocado en nuestro caso pues la LCRS procede de un proceso en el que se han retirado moléculas unidas no covalentemente presentes en la preparación comercial.

¹⁹⁷ Gu, Q.M.; Reddy, D.R. y Sih, C.J. (1986) *Tetrahedron Lett.*, **27**, 5203-6.

Por otro lado, es de destacar la notable diferencia de velocidad que aparece cuando la reacción está catalizada por UAB en las condiciones óptimas de hidratación (50 μ l agua/mg de enzima). Ello ha de atribuirse a la diferente composición en isoenzimas de la LCRC y UAB (Tabla IV.6).

Teniendo presente estos resultados, deduciríamos que la LIP 2, sólo presente en la muestra UAB, es mucho más sensible a la hidratación que la LIP 1, presente en la LCRC. Así mismo, estos datos nos permiten dar una nueva interpretación a los resultados de la Tabla IV.7, y justificar la pobre actividad ester sintetasa descrita para la lipasa UAB. La reacción allí descrita, se hizo sin añadir agua, por lo que la LIP 2 no estaría hidratada y no catalizaría la reacción de síntesis, tal y como se ve en esa Tabla. Con ello, podemos decir que controlando las condiciones de fermentación hemos obtenido un preparado más activo catalíticamente que la LCRC a altos niveles de hidratación.

Para concluir podemos decir que a través de las isotermas de sorción de agua de los preparados enzimáticos se han podido diseñar las condiciones de hidratación idóneas para su aplicación en síntesis en medio orgánico y en consecuencia obtener los mejores resultados en cuanto a la conversión en ester y mejorar la enantioselectividad de la enzima.

2. Influencia de las condiciones de fermentación seguidas en la producción de lipasa sobre su actividad catalítica.

Las condiciones experimentales fueron descritas en la *Parte experimental*. El objetivo de este ensayo consiste en determinar si, manipulando las condiciones de fermentación, se pueden obtener biocatalizadores que presenten diferentes actividades en reacciones biocatalizadas en medio orgánico. Los preparados obtenidos se designaron como UAB, UAB-1000 y UAB-300 y las condiciones de fermentación están expuestas en la Tabla III.2. Las diferencias entre ellos quedaron patentes en la caracterización discutida en el Apartado IV.1 de este Capítulo (Tabla IV.6) frente a sustratos naturales. Seguidamente se procedió a la determinación de su actividad empleándolos como biocatalizadores en reacciones de esterificación de sustratos no naturales como los ácidos (*R,S*) 2- aril propanoicos, empleando como sustratos el ácido (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico, el ácido (*S*) 2-fenil propanoico, el ácido (*R*) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico y el ácido (*S*) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico. Las reacciones se hicieron sin añadir agua al medio pero empleando el disolvente sin secar ($a_w \leq 1$).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV.28 donde se exponen las velocidades de reacción en mmoles de ester sintetizados por mg de proteína por hora de reacción. Los valores obtenidos se comparan con los obtenidos para la LCRC (catalizador de referencia).

Podemos comprobar cuando trabajamos sin adición de agua que la lipasa UAB es mucho más activa con sustratos pequeños como el ácido (*S*) 2-fenil propanoico que con sustratos grandes como el 2-(4-isobutil)fenil propanoico y el (*R*) o (*S*) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico. El caso de la lipasa UAB-1000, al igual que ocurre con la LCRC, la actividad catalítica en la esterificación del (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico es mayor que en los otros casos.

Así pues cada enzima cruda presenta un patrón de actividad catalítica que se ha de relacionar con la cantidad de proteína (Tabla I.1) y la naturaleza y proporción de las isoformas (Tabla IV.4).

Tabla IV.28. Velocidades iniciales de reacción (mmoles de ester sintetizados/por mg de proteína/hora) de las lipasas UAB y la LCRC, frente a ácidos 2-aril propiónicos. Condiciones de reacción. [ácido] = [alcohol] = 66mM, 30 °C, 500 rpm, volumen final 10 ml, disolvente: isooctano.

Sustrato	mmoles de ester sintetizados/mg de proteína/hora			
	LCRC	UAB	UAB-1000	UAB-300
	Sin adición de agua.			
(R,S) 2-(4-isobutilfenil) propanoico	$3,0 \cdot 10^{-4}$	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-5}$
(S) 2-fenil propanoico	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$5,5 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-5}$	0
(R) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico	$9,5 \cdot 10^{-7}$	$2,0 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$
(S) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico	$6,5 \cdot 10^{-7}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$
v_S/v_R (2-(3'-benzoilfenil) propanoico)	0,68	11,8	0,97	1,3
	Con adición de agua.			
(R) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico	0	$6,5 \cdot 10^{-5}$	$2,0 \cdot 10^{-5}$	$4,0 \cdot 10^{-5}$
(S) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico	$4,0 \cdot 10^{-6}$	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$4,5 \cdot 10^{-5}$
v_S/v_R (2-(3'-benzoilfenil) propanoico)	-	3,43	1,23	1,04

Por otro lado, en estas condiciones de ausencia de agua añadida al medio de reacción vemos que UAB presenta mayor actividad que la preparación comercial LCRC, en el caso de catalizar la esterificación de un sustrato tan voluminoso como el 2-(3'-benzoilfenil) propanoico; siendo especialmente la UAB, precipitada en presencia de lactosa tras su obtención en el proceso de fermentación, la que dio la mayor velocidad. Esto podría explicarse por una diferente proporción de las isoenzimas en estas lipasas crudas como ya se comentó en el Apartado correspondiente a la caracterización de las lipasas (Sección IV.1).

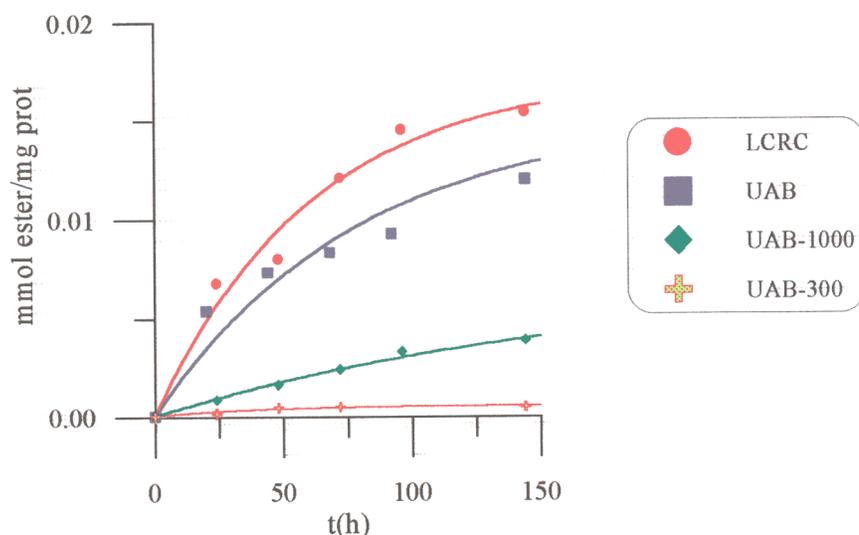
Cuando analizamos los resultados correspondientes a la esterificación de los ácidos (*R*) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico y (*S*) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico, observamos que la actividad es mayor en las *lipasas* UAB que en la preparación comercial LCRC, manteniéndose en los casos en los que se adiciona agua la *S*-enantiopreferencia, tal y como se muestra en la Tabla IV.28, en las relaciones de las velocidades de esterificación entre el (*S*) y (*R*) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico (v_S/v_R). La *S*-enantioespecificidad también fue mostrada en la hidrólisis del ester metílico del (*R,S*) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico.²⁶⁸

Cuando añadimos agua al medio advertimos que la LCRC se vuelve prácticamente enantioespecífica, mientras que la lipasa UAB mantiene su enantioselectividad hacia el isómero *S*(+) del 2-(3'-benzoilfenil) propanoico. Este comportamiento está de acuerdo con la distinta proporción y naturaleza de las isoenzimas en ambos tipos de lipasas crudas (Tabla IV.6). Así las lipasas tipo UAB, que tienen un porcentaje relativo muy semejante de isoenzimas LIP 3 y LIP 2, dan similares velocidades relativas de esterificación de cada estereoisómero (Tabla IV.27); mientras que la LCRC que tiene LIP 3>>LIP 1 es casi enantioespecífica. Así pues debemos pensar que la LIP 3 es la más activa frente a este tipo de sustratos y que quizá LIP 2 tenga una enantioselectividad opuesta a LIP 3.

En la Figura IV.39 presentamos el perfil de la reacción de esterificación del el ácido (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico con *n*-propanol en isooctano catalizada por las diferentes preparaciones ensayadas. Las condiciones de reacción fueron: (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico 66mM, *n*-propanol 66 mM, 10 ml de isooctano, 200 mg de preparado enzimático, 30 °C y 500 rpm.

²⁶⁸ Botta, M.; Cernia, E.; Corelli, F.; Manetti, F. y Soro, S. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1337**, 302-310.

Figura IV.42. Reacción de esterificación de (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico con n-propanol en isooctano con las preparaciones ensayadas: LCRC, UAB, UAB-1000 y UAB-300. Condiciones de reacción: [ácido] = [alcohol] = 66mM, 18 mg de proteína, 30 °C, 500 rpm, volumen final 10 ml, disolvente: isooctano.

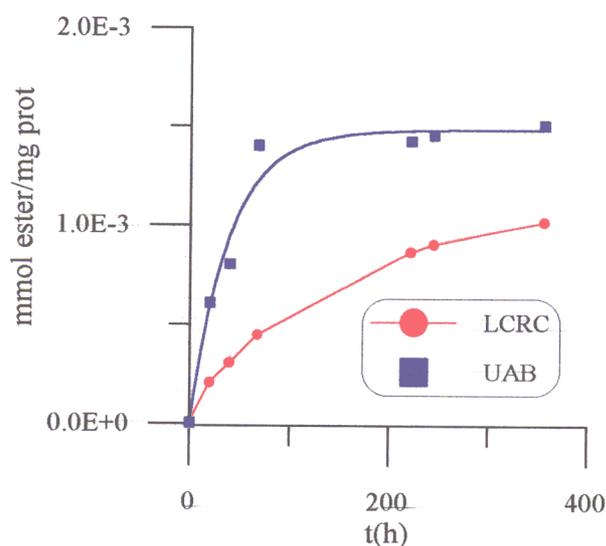


Como habíamos comentado anteriormente la mayor velocidad se alcanza con el preparado comercial (LCRC) seguido de la UAB. Con UAB-300 apenas hay conversión a las 150 h de reacción. Debido a que el ácido (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico, dada su lipofilia ($\pi = 4,29$) (Tabla III.6), es un sustrato muy bueno para la esterificación en medio orgánico catalizada por la lipasa de *Candida rugosa*, se procedió a estudiar la actividad catalítica de los preparados enzimáticos en la esterificación de sustratos para los que había menos afinidad, como el ácido (*R,S*) 2-fenil propanoico ($\pi = 1,18$).

En la Figura IV.43 se presentan los perfiles de la reacción de esterificación del ácido (*R,S*) 2-fenil propiónico catalizada por UAB y por LCRC. Podemos ver que hay una notable diferencia cuando la reacción está catalizada por UAB, esto nos indica que estamos trabajando con preparaciones que presentan un diferente contenido en isoformas y en consecuencia tienen diferente comportamiento al catalizar una reacción de esterificación en las mismas condiciones experimentales. El hecho de que la LCRC tenga tan poca actividad se debería a un efecto

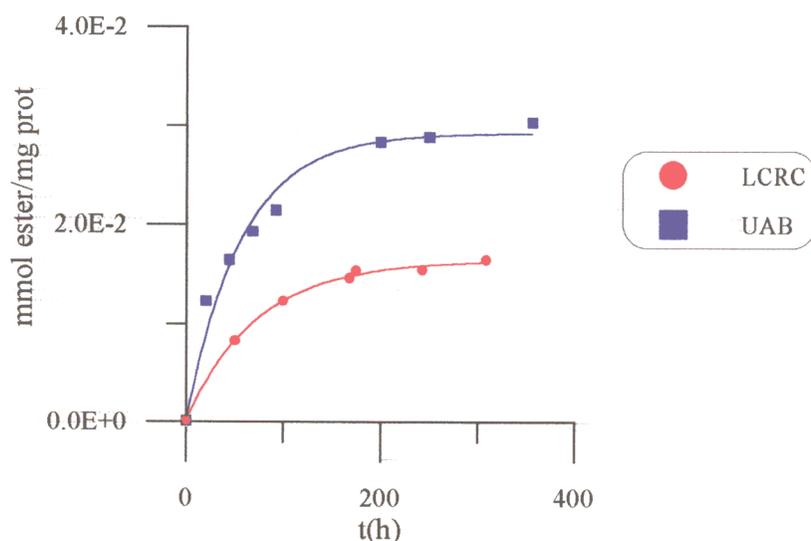
inhibitorio del isómero (*R*) en el caso de la LCRC, ya que ambas enzimas presentan un valor de velocidad inicial de esterificación semejante para los isómeros (*R*) y (*S*) (Tabla. IV.25). Esto debe también ser cierto para la lipasa UAB, si bien en menor medida pues su actividad catalítica es un orden de magnitud menor que la obtenida con sólo el isómero *S*(+) (Figura IV.45).

Figura IV.43. Reacción de esterificación del ácido (*R,S*) 2-fenil propiónico con *n*-propanol en isooctano, catalizada por LCRC y UAB. Condiciones de reacción: [ácido]=[alcohol]= 66 mM, 10 ml de isooctano, 35 mg de proteína, 30 °C y 500 r.p.m.



Sin embargo, y para tener una idea del comportamiento de estos preparados se procedió a realizar esta misma reacción con el enantiómero (*S*) del ácido 2-fenil propiónico, lo cual nos daba igualmente una idea de la enantioselectividad de estas enzimas. En la Figura IV.44 presentamos el perfil de las reacciones con las preparaciones LCRC y UAB para el isómero *S*(+), frente al cual presenta máxima actividad catalítica.

Figura IV.44. Reacción de esterificación del ácido (*S*) 2-fenil propiónico con *n*-propanol en isoocetano, catalizada por LCRC y UAB. Condiciones de reacción: [ácido]=[alcohol] = 66 mM, 10 ml de isoocetano, 35 mg de proteína, 30 °C y 500 r.p.m.



En esta reacción queda patente la mayor velocidad de reacción cuando la esterificación está catalizada por UAB, respecto a LCRC. Si bien las dos preparaciones muestran una marcada *S*-enantioselectividad, la velocidad que presenta UAB ($5,5 \cdot 10^{-4}$ mmoles de éster sintetizado/mg de proteína/h frente a $3,8 \cdot 10^{-5}$ mmoles de éster sintetizado/mg de proteína/h para el racémico) es prácticamente el doble de la que presenta la LCRC ($2,5 \cdot 10^{-4}$ mmoles de éster sintetizado/mg de proteína/h, frente a $6,5 \cdot 10^{-7}$ mmoles de éster sintetizado/mg de proteína/h que tiene para el correspondiente racémico). Estos resultados nos reafirman en que estas lipasas obtenidas por condiciones de fermentación controladas presentan diferente comportamiento en la catálisis de la esterificación en medio orgánico al tener diferente composición de isoformas (Tabla IV.6).

A partir de estos resultados procedimos a trabajar en la esterificación de los dos estereoisómeros del 2-(3'-benzoilfenil) propanoico, un sustrato que mostraba *a priori* dificultades

en el proceso, debido a que su geometría suponía un importante impedimento estérico,^{190,272} pero que podía favorecer la comprensión de los resultados y un mejor conocimiento de los biocatalizadores con los que se trabajaba. Para este ensayo y debido al interés que despertó en nuestro grupo los resultados obtenidos sobre la influencia del estado de hidratación del sistema en la actividad de la enzima, se trabajó en dos tipos de condiciones, denominadas:

i) *sin agua*: medio formado por 10 ml de isooctano, sin adición de agua,

ii) *con agua*: medio formado por 8 ml de isooctano y 2 ml de agua (cantidad correspondiente a 200 μ l de agua/ml de disolvente). Estas últimas condiciones nos aseguraban trabajar a $a_w \approx 1$.

En general, el protocolo que se siguió en el experimento, fue el mismo que para el resto de los sustratos: ácido 2-(3'-benzoilfenil) propanoico 66mM, n-propanol 66 mM, 10 ml de isooctano, 200 mg de preparado enzimático, 30 °C y 500 rpm.

En la Figura IV.45 se muestran los resultados obtenidos en la esterificación del (*R*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico cuando no se añadía agua al medio. En este caso con la LCRC no presenta apenas conversión en la esterificación a las 200 h de iniciarse la reacción. Esto se debe al gran impedimento estérico de este sustrato y a que esta lipasa es *S*-enantiopreferente y en consecuencia no aparecen resultados significativos. Los mejores valores aparecen cuando la reacción está catalizada por la UAB seguida de UAB-300. Estos resultados son importantes dadas las características del sustrato empleado y además en las condiciones anhidras diseñadas. No

¹⁹⁰ Hernáiz, M.J.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1994) *Tetrahedron*, **50**, 10749-10760.

²⁷² Sih, Ch.J.; Gu, Q.-M. y Reddy, D.R: (1986) En: *Trends in Medical Chemistry*, 181-194. Ed.: Mutschler, E. y Winterfeldt, E., VCH, R.F.A.

obstante, los bajos rendimientos obtenidos no son relevantes ya que las bajas conversiones alcanzadas nos impiden sacar conclusiones sobre estos derivados.

Figura IV.45. Reacción de esterificación de (*R*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico con n-propanol en isooctano, 17% de proteína, sin adición de agua; las preparaciones ensayadas fueron: LCRC, UAB, UAB-1000 y UAB-300. Condiciones de reacción: [ácido]=[alcohol]= 66 mM, 10 ml de isooctano, 30 °C y 500 r.p.m.

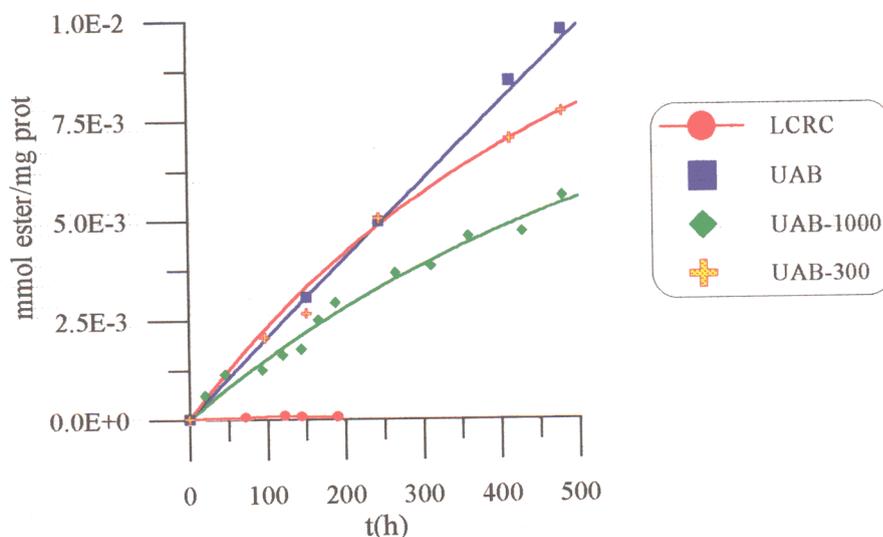
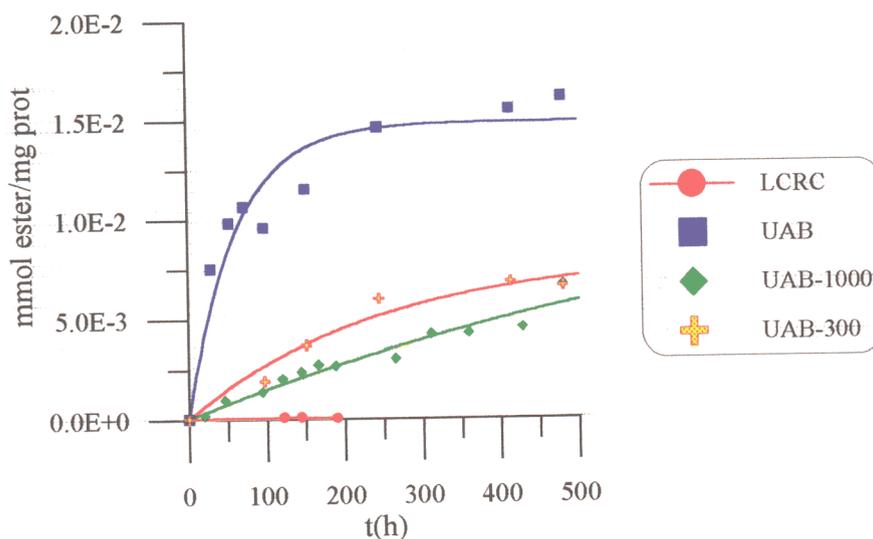


Figura IV.46. Reacción de esterificación de (*S*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico con n-propanol en isooctano, 17% de proteína, sin adición de agua; las preparaciones ensayadas fueron: LCRC, UAB, UAB-1000 y UAB-300. Condiciones de reacción: [ácido]=[alcohol]= 66 mM, 10 ml de isooctano, 30 °C y 500 r.p.m.

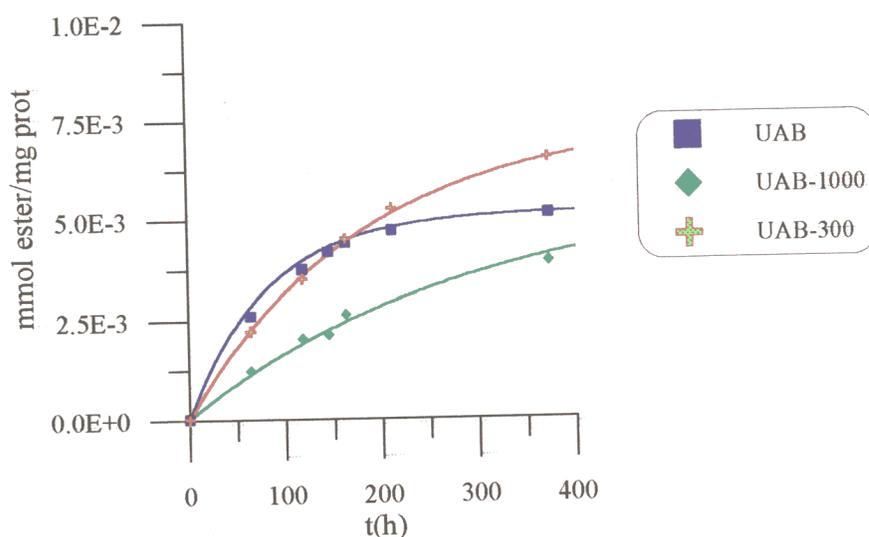


En la Figura IV.46 se muestra el perfil de las curvas correspondientes a la esterificación del (*S*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico en condiciones anhidras y catalizado por las diferentes preparaciones ensayadas. En este caso también es la preparación UAB la que presenta mayor

velocidad de reacción, seguida de UAB-300 y UAB-1000. Con la LCRC, las conversiones alcanzadas son tan despreciables, que carecen de relevancia.

Cuando la reacción se llevó a cabo añadiendo agua, se trabajó en unas condiciones de máxima hidratación, con un valor de $a_w \approx 1,0$. En este caso, sí se pudo observar diferencias significativas en cuanto a la actividad y enantioselectividad de los preparados, percibiéndose en todos los casos un aumento de la actividad, debido a que la adición de agua provocaba en los preparados la formación de la monocapa de moléculas de agua que toda enzima requiere para alcanzar su conformación catalíticamente activa. En el caso de la esterificación del ácido (*R*) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico con *n*-propanol en isooctano y con adición de agua (0,2 ml/ml de isooctano), con la LCRC no hubo reacción, mientras que los mejores resultados se obtuvieron con las preparaciones UAB y UAB-300, tal y como se muestra en la Figura IV.47.

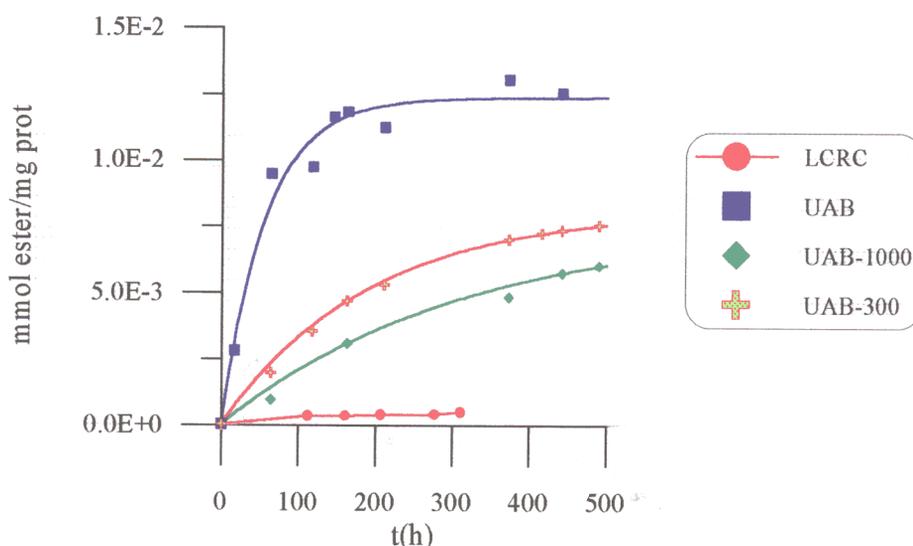
Figura IV.47. Reacción de esterificación de (*R*) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico con *n*-propanol en isooctano, con adición de agua (0,2 ml/ml de disolvente), 17% de proteína; las preparaciones ensayadas fueron: LCRC, UAB, UAB-1000 y UAB-300. Condiciones de reacción: [ácido]=[alcohol]= 66 mM, 10 ml de isooctano, 30 °C y 500 r.p.m.



Por otro lado, en la esterificación del ácido (*S*) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico con *n*-propanol en isooctano y con adición de agua (0,2 ml/ml de isooctano) con la LCRC sí hubo

reacción pero con muy bajas conversiones, tal y como se muestra en la Figura IV.48; la máxima conversión se obtuvo con la UAB, que presentó una marcada *S*-enantioselectividad al manifestar una velocidad inicial de esterificación del (*S*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico de $2 \cdot 10^{-4}$ mmoles de ester sintetizado/mg de proteína/h mientras que con el (*R*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico fue de $6 \cdot 10^{-5}$ mmoles de ester sintetizado/mg de proteína/h), alcanzando la máxima conversión a las 200 h. Para los otros dos preparados, UAB-1000 y UAB-300, las conversiones alcanzadas son menores (UAB-300 > UAB-1000) no mostrando diferencias significativas en cuanto enantioselectividad se refiere a la hora de distinguir a los dos enantiómeros.

Figura IV.48. Reacción de esterificación de (*S*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico con n-propanol en isoocetano, con adición de agua (0,2 ml/ml de disolvente), 17% de proteína; las preparaciones ensayadas fueron: LCRC, UAB, UAB-1000 y UAB-300. Condiciones de reacción: [ácido]= [alcohol] = 66 mM, 10 ml de isoocetano, 30 °C y 500 r.p.m.



En resumen, puede apreciarse que siempre las enzimas son *S*-esteropreferentes como ya se mostró anteriormente. Así mismo indicar que la LCRC es muy poco activa tanto en presencia como en ausencia de agua en la esterificación de este ácido. Un resultado análogo ha sido

indicado por García y col.²⁶² Así pues, teniendo presente los datos de la Tabla IV.6, diremos que la LIP 2 es más activa como catalizador en este proceso que LIP 3 y un estudio más detallado de los datos nos indica que la lipasa UAB es la más activa frente al ácido *S*, si bien frente al ácido *R* muestra la lipasa UAB una actividad similar a la lipasa UAB-300. Ambos biocatalizadores presentan la misma proporción de LIP 3 y LIP 2 (Tabla IV.6), pero la proporción de proteína es menor en la lipasa UAB-300 (Tabla IV.6).

Puede apreciarse en las Figuras IV.47 y IV.48 que la adición de agua al medio hasta $(a_w)_0 \approx 1,0$ ejerce un efecto ligeramente negativo sobre la actividad catalítica de la lipasa UAB tanto en el caso del isómero *S* como del *R*. Al contrario, las lipasas UAB-1000 y UAB-300 parecen ser bastante insensibles a la presencia o ausencia de agua pues presentan una actividad catalítica semejante.

A partir de estos resultados podemos confirmar que el control de las condiciones de fermentación afecta a la naturaleza y proporción de isoenzimas y por ello a la actividad catalítica y a la enantioselectividad de la lipasa de *Candida rugosa*.²⁷³

Así mismo también se estudió la influencia que tenían los disolventes con diferente log P sobre la actividad de la preparación UAB en un medio de reacción en ausencia de agua añadida; ello nos permitía comprobar la influencia de la polaridad del medio en el grado de hidratación del biocatalizador y en consecuencia sobre su actividad catalítica. En este caso las condiciones de reacción consistieron en la esterificación del ácido (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propiónico con *n*-propanol. Los resultados se muestran en la Tabla IV.29.

²⁶² García, M., Gradillas, A., del Campo, C., Llama, E., Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1997) *Biotechnol. Lett.*, 10, 999-1004.

²⁷³ De la Casa, R.M.; Sánchez, A.; Sinisterra, J.V. y Sánchez-Montero, J.M. (1998) En *Stability and Stabilization of Biocatalysts*. Ed.: Ballesteros, A.; Plou, F.J.; Iborra, J.L. y Halling, P.J. Elsevier Sc. B.V.p: 735-740.

Tabla IV.29. Resultados obtenidos en % de conversión en la esterificación del ácido 2-(4-isobutilfenil) propanoico con n-propanol. Condiciones de reacción: [ácido]=[alcohol] = 66 mM, 10 ml de isooctano, 200 mg de preparado (35 % de proteína), 30 °C y 500 r.p.m.

t(h)	Isooctano	Ciclohexano	1,1,1-tricloroetano
30	31	36,5	38
80	46	50	57
136	55,5	55	56

Podemos apreciar que cuando se analizan los resultados a tiempos cortos de reacción (t = 30 h) hay una ligera diferencia cuando se trabaja con disolventes con cierto carácter hidrofílico como el 1,1,1-tricloroetano ($\log P = 2,49$), donde aparece un porcentaje de conversión superior a cuando el disolvente es ciclohexano ($\log P = 3,44$); y cuando el disolvente es muy hidrofóbico como el isooctano ($\log P = 5,8$), la conversión es menor. Sin embargo a las 136 h de reacción la conversión alcanzada en los diferentes medios orgánicos empleados es similar. Con ello, podemos afirmar que la preparación UAB trabaja mejor en medios poco hidrofóbicos y de los resultados de la Tabla IV.28 deducimos igualmente que la velocidad de reacción se ve incrementada cuando se adiciona agua al medio.

3. Influencia de la presencia de cosolventes como miméticos del agua en la esterificación del ácido 2-(3`benzoil)-fenil propanoico usando la lipasa de *Candida rugosa*.

Hasta el momento hemos podido comprobar cómo el grado de hidratación de un biocatalizador afectaba a su actividad catalítica y esto repercutía en el rendimiento final de la reacción y consecuentemente en la enantioselectividad del proceso.

La cantidad de agua presente en el microentorno que rodea a la superficie del biocatalizador es compatible con la requerida para desarrollar la actividad enzimática, pues facilita la flexibilidad necesaria para la catálisis.⁴⁶ Teniendo en cuenta que los movimientos internos de la proteína en estado sólido son resultantes del aumento de flexibilidad son esenciales para la actividad enzimática.

Desde el punto de vista mecánico, el papel del agua como lubricante se basa en la capacidad de formar enlaces de hidrógeno con grupos funcionales de la molécula de proteína, los cuales, están unidos unos a otros dando lugar a una estructura ordenada. De ahí que sea posible que otros compuestos propensos a formar enlaces de hidrógeno (por ejemplo, glicerol, etilenglicol) puedan actuar de manera similar. La eficiencia de estos compuestos depende de su potencial para formar estos enlaces, lo que provoca una mayor movilidad conformacional de la enzima.

Además de esto, la ventaja de sustituir las moléculas de agua por estos *miméticos* en las reacciones de esterificación donde el agua es un producto, es que el equilibrio de la reacción está

⁴⁶ Zaks, A. y Klivanov, A.M. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 8017-8021.

favorecido hacia la síntesis, evitando la reversibilidad hacia la reacción de hidrólisis, que se provocaría en el caso de que hubiese un exceso de agua en el medio.

Por ello se abordó el estudio de la influencia de disolventes polares que presentes en el medio de reacción en pequeñas concentraciones, pudieran actuar como miméticos de moléculas de agua. Para este estudio se utilizó como reacción test la esterificación del ácido 2-(3'-benzoilfenil) propanoico con n-propanol, empleando diferentes disolventes, variando las condiciones de hidratación y fundamentalmente alterando la relación molar ácido/alcohol.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV.30, en ella se exponen las condiciones de reacción empleadas para poner a punto el protocolo y determinar los requisitos necesarios para poder hacer una determinación de la influencia sobre la conversión de la sustitución de la adición de agua al medio de reacción por la de otros disolventes.

En un principio la relación ácido/alcohol empleada fue 1/1, ya que era la que había sido utilizada para la esterificación de ácidos 2-aril propiónicos; se mantuvieron constantes el resto de los parámetros como el volumen de disolvente (10 ml), la cantidad de biocatalizador (20 mg/ml), la temperatura (30 °C) y la agitación (500 rpm) y se calculó por cromatografía de gases el porcentaje de conversión obtenido a las 200 h de reacción.

Cuando se empleó como disolvente la isobutil metil cetona ($\log P = 1,31$) no hubo reacción como se había comprobado anteriormente debido a las características altamente hidrofílicas que hacían de este solvente un medio incompatible para la síntesis catalizada por LCRC.²⁴⁸ En el caso del tolueno ($\log P = 2,5$) todavía es lo suficiente hidrófilo como para que la preparación comercial sea capaz de catalizar la esterificación. Se probó disminuir la polaridad de

²⁴⁸ De la Casa, R.M. (1994) *Tesina de Licenciatura*. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense.

este disolvente mezclándolo con isooctano en una relación (6/4 v/v), pero en estas condiciones tampoco aparecieron resultados relevantes en conversión y finalmente la última estrategia probada fue el empleo de un disolvente hidrófobo como el isooctano ($\log P = 5,18$) como medio orgánico y en este caso tampoco se apreció conversión significativa en ester a las 200 h de reacción. Por tanto en las primeras condiciones probadas, al trabajar en ausencia de agua y con relación ácido/alcohol 1:1 no hay reacción, sea cual sea la polaridad del disolvente.

Tabla IV.30. Esterificación del -2-(3'-benzoilfenil) propanoico (66mM) con n-propanol (66mM) catalizada por LCRC, 20 mg de preparado enzimático/ml de disolvente. Disolvente 10 ml. T = 30 °C. Agitación 500 rpm. t_r = 200 h.

Disolvente	Relación molar ácido/alcohol	Agua (μ l/mg enzima)	%-(R)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico	% (S) -2-(3'-benzoilfenil) propanoico
Isobutil metil cetona	1/1	0,0	-	-
Isooctano	1/1	0	-	-
Tolueno	1/1	0,0	-	-
Isooctano/tolueno ^a	1/1	0,0	-	-
Isooctano	1/4	0,0	1,5	2
Isooctano	1/4	1,0	3	10
Isooctano/tolueno ^b	1/4	1,0	1,5	3
Eter diisopropílico	1/4	1	-	-
Isooctano	1/4	10,0	-	14
Isooctano	1/8	10,0	6,0	7,0
Ciclohexano	1/4	10,0	3,0	7,0
Ciclohexano	1/8	10,0	1,0	2

a) Isooctano/tolueno =6/4 v/v

b) Isooctano/tolueno =9/1 v/v

Por eso, el siguiente paso del estudio fue probar a aumentar la relación ácido/alcohol a 1/4 y probar empleando como disolvente el isooctano que dada su hidrofobicidad era idóneo para la síntesis del ester catalizada por LCRC. En este caso y sin adición de agua al medio se detectó un 1,5 % de conversión en el ester del (*R*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico y un 2 % en (*S*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico. Así pues en estas condiciones no hay enantioselectividad en la enzima progresando la esterificación por el exceso de alcohol según los principios de la química.

Ante estos resultados se probó la influencia de la adición de 1 μ l de agua/mg de enzima al medio y la consecuencia fue la obtención de un 10 % de conversión en el ester (*S*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico. Luego la adición de agua, debe hidratar la superficie hasta un valor de $a_w \approx 1$ (ver Figura IV.29) donde ya la enzima tiene flexibilidad^{35,46} y puede distinguir entre ambos estereoisómeros.

Igualmente se analizó la presencia del agua empleando un medio menos hidrófobo, mezclando isooctano y tolueno en una relación (9/1 v/v), sin embargo, en este caso la conversión en ester del (*S*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico sólo alcanzó el 3 %. Trabajando en las mismas condiciones de adición de agua se empleó el éter diisopropílico ($\log P = 2,0$), pero no se apreció ningún resultado en la conversión. Estos resultados ponen de manifiesto la actividad captora de agua del medio hidrófilo, que haría que el $a_w \ll 1$.

Como la adición de agua pareció dar resultados relevantes, se procedió a esterificar el ácido carboxílico empleando el mejor disolvente (isooctano) y añadiendo 10 μ l de agua/mg de enzima; en estas condiciones no hubo reacción con el ácido (*R*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico,

³⁵ Wescott, C.R. y Klibanov, A.M. (1993) *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 1629-31.

⁴⁶ Zaks, A. y Klibanov, A.M. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 8017-8021.

pero se llegó hasta un 14 % del ester del (*S*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico a las 200 h de reacción, aumentando considerablemente en estas condiciones la enantioselectividad del biocatalizador. Esto indica que una mayor cantidad de agua puede hidratar más la masa del biocatalizador aumentando el número de moléculas activas de la enzima. Dadas las características hidrofóbicas de este disolvente se estudió la reacción, en las mismas condiciones con otro disolvente con alto log P (log P = 3,44), como el ciclohexano. En este caso se llegó a un 3 % de ester (*R*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico y a un 7 % de ester (*S*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico. Esto indica que el agua favorece la enantioselectividad de la enzima al aumentar su grado de flexibilidad. Dado que el ciclohexano es más hidrófilo, el grado de hidratación de la masa del biocatalizador será menor y por ello la flexibilidad inferior que en isooctano. Eso explica las menores conversiones y enantioselectividades observadas en ciclohexano respecto a isooctano. Este punto ya ha sido discutido por otros autores como Kawashiro y col.²⁴ para la α -quimotripsina en la reacción de transesterificación.

Como la presencia de una mayor cantidad de n-propanol, al aumentar la relación molar ácido/alcohol hasta 1/4, pareció mejorar los resultados, se realizó la esterificación aumentando hasta 1/8 la relación ácido/alcohol y empleando isooctano como disolvente. Puede observarse que el proceso pierde enantioselectividad y disminuye considerablemente el rendimiento final de la reacción, alcanzándose tan sólo un 7 % del ester del (*S*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico. Mientras que cuando se utilizó el ciclohexano, tampoco hay enantioselectividad y la conversión final alcanzada llega a un 2 % de ester del (*S*)-esteroisómero. Esto se deberá a un aumento de la inespecífica esterificación por vía química al poner un reactivo en fuerte exceso.

²⁴ Kawashiro, K.; Sugahara, H.; Sugiyama, Sh. y Hayashi, H. (1995) *Biotechnol. Lett.*, **17**, 1161-6.

Así pues el disolvente claramente compite con la enzima por el agua del medio y según el disolvente se tendrá que añadir una proporción de agua o del mimético del agua.

Dado que los mejores resultados obtenidos en cuanto a rendimiento y enantioselectividad se han conseguido con una relación molar ácido/alcohol (1/4), 10 µl de agua/mg de enzima y utilizando el isooctano como disolvente, el siguiente paso ha sido sustituir el agua añadida al medio de la reacción por un disolvente que actuara emulando las propiedades de la misma comportándose como mimético. Como disolventes se emplearon alcoholes por su analogía con el agua a la hora de la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo -OH del alcohol y los grupos polares de la proteína, que mimetizan los formados entre los OH del agua y la proteína.

El empleo de alcoholes como aditivos polares se ha aplicado a diferentes tipos de reacción. Así Mattiasson y col.²⁷⁴ han conseguido favorecer la migración del grupo acilo en la 2-monooleína con el empleo de alcoholes miscibles en agua, trabajando en condiciones anhidras.

Este tipo de aditivos se caracteriza por ejercer un efecto macromolecular y molecular en el comportamiento catalítico.²⁷⁵ Por un lado ejercen efectos macroscópicos a través de parámetros físico-químicos y/o termodinámicos como es la a_w , viscosidad, tensión superficial, etc.; y por otro lado, pueden ejercer efectos a nivel molecular modificando directamente la conformación de la proteína. Ambos efectos actúan sobre la catálisis enzimática alterando la actividad y especificidad.

²⁷⁴ Fureby, A.M.; Virto, C.; Adlercreutz, P. y Mattiasson, B. (1996) *Biocatal. Biotransform.*, **14**(2), 89-111.

²⁷⁵ Lambert, C.; Pourplanche, C. y Larreta-Garde, V. (1997) *Biocatal. Biotransform.*, **15**(1), 39-55.

En la misma línea, McMinn y col.⁴⁷ al estudiar la isoterma de sorción de diferentes suspensiones enzimáticas en distintos disolventes comprueban que con altos valores de a_w la absorción de agua por parte del biocatalizador es inferior en presencia de alcoholes, siendo este descenso de la absorción mucho más manifiesto en presencia de propanol. Estos autores refieren este efecto a la competición del disolvente con el agua por los sitios de unión de las moléculas de agua de la proteína.

Como miméticos se han utilizado: etanol, propanol, octanol, isopropanol y terc-butanol a una concentración de 198mM empleando isooctano como disolvente apolar (para que no captara agua), y una relación molar de (*S*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico (el más activo)/n-propanol = 1/1.

Para ver si los alcoholes miméticos empleados podrían esterificarse dando una reacción parásita a la que estábamos estudiando, se realizaron las reacciones de esterificación empleando estos miméticos como sustratos de la esterificación. Los resultados mostraron que únicamente el propanol y el etanol actuaban como sustratos de la reacción de esterificación.

En la Tabla IV.31 se muestran los resultados obtenidos al efectuar la adición de diferentes alcoholes al medio de reacción, en la esterificación del (*S*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico (66 mM) con n-propanol (66mM) en 10 ml de isooctano a 30 °C y 20 mg de LCRC/ml de disolvente. En todos los casos la relación ácido/alcohol fue de 1/4, siendo la concentración del alcohol sustrato añadido 1-propanol de 66 mM (para respetar las condiciones hasta ahora utilizadas), mientras que la del alcohol mimético adicionado fue 198 mM. Así mismo también se comprobó el resultado cuando todo el alcohol añadido era etanol.

⁴⁷ McMinn, J.H.; Sowa, M.J.; Chanick, S.B.; Paulaitis, M.E. (1993) *Biopolymers*, **33**, 1213-1224.

De las conversiones obtenidas podemos observar que cuando se emplea etanol sólo o isopropanol/n-propanol como medio se obtienen conversiones inferiores en (*S*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoato de etilo ó de propilo respectivamente que en el caso de emplear agua/n-propanol.

Tabla IV.31. Conversión (%) a 400 h de reacción en la esterificación de (*S*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico con n-propanol con la adición de diferentes alcoholes en una concentración 198 mM. Condiciones de reacción: [ácido]= [alcohol] = 66 mM, 10 ml de isooctano, 200 mg de LCRC, 30 °C y 500 r.p.m.

Alcoholes	Conversión (%)
Etanol/1-propanol	20
Octanol/1-propanol	17
Isopropanol/1-propanol	11
Tercbutanol/1-propanol	24
Etanol ^a	10
Agua ^b	14

^a Corresponde a etanol 264 mM. Acido/etanol (1/4).

^b Corresponde una adición de 10 µl/mg de enzima. Acido/n-propanol (1/4).

De ello deduciríamos que el isopropanol parece actuar como desnaturalizante de la proteína y que el etanol es peor sustrato que el propanol. Así pues estos dos alcoholes no ejercen una acción beneficiosa sobre el proceso de esterificación.

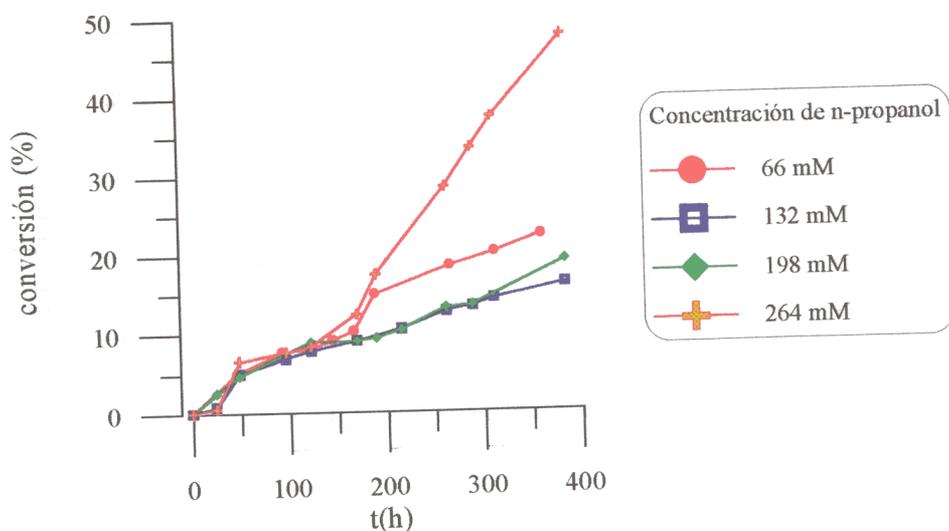
Por el contrario la mezcla etanol/propanol sí que conduce a mejores conversiones de ester; lo mismo ocurre en el caso del n-octanol. Por último, los mejores resultados se obtienen con el terc-butanol, que no es esterificado por el ácido en presencia de la enzima y por ello, debería actuar sólo como mimetizador del agua.

Por esta razón se estudió la misma reacción de esterificación empleando una concentración de terc-butanol 198 mM, y variando la concentración de 1-propanol en cantidades crecientes. Las condiciones de reacción fueron: (*S*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico (66mM), tercbutanol (198 mM), LCRC (20 mg/ml) en un volumen final de 10 ml de isooctano. El perfil

de las curvas obtenidas al representar el porcentaje de esterificación en función del tiempo aparecen en la Figura IV.49.

Esta diferencia de comportamiento respecto a las otras relaciones molares puede ser provocada debido a que la alta concentración de este alcohol permite una mejor disolución del sustrato, salvando barreras difusionales que pueden impedir la interacción del biocatalizador con los sustratos y la formación del complejo acil-enzima. También hay que indicar que en este caso se obtiene un 20 % de conversión a ester mayor que el obtenido en agua en condiciones similares de relación molar ácido/alcohol y de concentración de agua (Tabla IV.30). Así pues, la adición del mimético de agua, tercbutanol, favorece el proceso de esterificación al evitarse la hidrólisis del ester formado, debida a la presencia de agua en el microentorno del catalizador sólido.

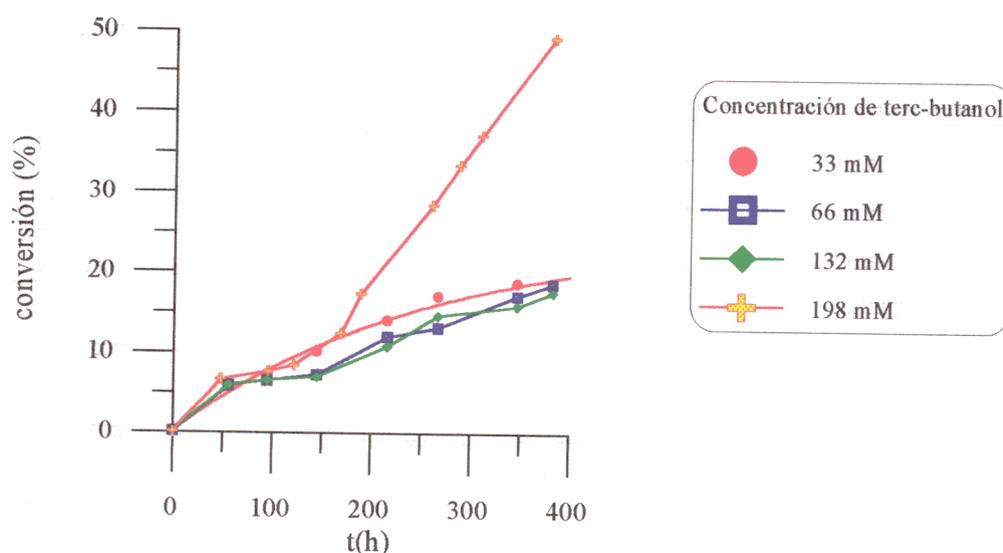
Figura IV.49. Esterificación de (*S*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico con tercbutanol (198 mM) con cantidades crecientes de *n*-propanol. Condiciones de reacción: [ácido]=[alcohol]= 66 mM, 10 ml de isooctano, 200 mg de preparado (35 % de proteína), 30 °C y 500 r.p.m.



En este proceso en que el agua ha sido substituido por el tercbutanol, se aprecia que la reacción tiene lugar obteniéndose las mismas conversiones salvo al emplear una cantidad de 264

mM de n-propanol, lo que implica una relación molar ácido/alcohol = 1/4 que es la óptima que vemos para el caso del agua (1 μ l/mg de enzima) (Tabla IV.30).

Figura IV.50. Esterificación de (*S*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico con tercbutanol (264 mM) con cantidades decrecientes de tercbutanol. Condiciones de reacción: [ácido]=[alcohol] = 66 mM, 10 ml de isoocetano, 200 mg de preparado (35 % de proteína), 30 °C y 500 r.p.m.



Para confirmar la influencia del mimético de agua en el rendimiento final de la reacción se procedió a la esterificación del mismo sustrato estudiado, empleando la concentración de 1-propanol que mejores resultados había dado (264 mM), y en este caso variando la concentración del alcohol adicionado que mejores rendimientos había proporcionado (tercbutanol). Los resultados se muestran en la Figura IV.50, donde se comprueba que con menores cantidades de tercbutanol no se alcanzan mejores rendimientos y que la proporción diseñada es la más idónea para llegar a una conversión en ester del (*S*)-2-(3'-benzoilfenil) propanoico del 50 %.

En alguna de estas curvas también se observa un período de inducción en los primeros tiempos de reacción, debido a que el biocatalizador se está acomodando a un medio en el que tenemos un disolvente altamente hidrófobo, con un sustrato poco lipófilo y en presencia de terc-butanol. El mimético de agua favorecería al igual que el agua, que el biocatalizador adoptara la

conformación activa mediante la formación de enlaces de hidrógeno con las partes polares de la enzima, igual que hace el agua.

Para concluir debemos decir que probablemente existe un efecto sinérgico de los dos alcoholes, el 1-propanol y el terbutanol, en el medio de reacción, siendo bastante arriesgado explicar el comportamiento exacto de cada uno de ellos por separado. Sí es seguro que la alta concentración de alcohol favorece la disolución del sustrato y la del producto que se genera a lo largo de la reacción. Aunque ambos alcoholes, debido a su grupo -OH pueden formar enlaces de hidrógeno con la proteína sustituyendo parcialmente el agua tal y como han descrito recientemente Halling y col.²⁷⁶ Este comportamiento reduce la cantidad de agua unida a la proteína respecto a la que tiene cuando está en aire, para un mismo valor de a_w . Sin embargo, medidas realizadas con etanol sugieren que esta diferencia en cuanto a la cantidad de agua unida a la proteína sólo es plausible a altos valores de a_w .^{193,47} Por tanto, parece ser el agua débilmente unida la que puede ser reemplazada. En cualquiera de los casos, para un determinado valor de a_w , el efecto sería disminuir el nivel de agua unida (respecto a la unida cuando la enzima está en aire). Estos alcoholes son además donadores de enlaces de hidrógeno, siendo ésta una importante característica para estabilizar la estructura catalítica de la proteína.

²⁷⁶ Bell, G.; Janssens, A. y Halling, P.J. (1997) *Enzyme Microb. Technol.*, **20**, 471-177.

¹⁹³ Halling, P. (1990) *Biochem. Biophys. Acta*, **1040**, 225-228.

⁴⁷ McMinn, J.H.; Sowa, M.J.; Chanick, S.B. y Paulaitis, M.E. (1993) *Biopolymers*, **33**, 1213-1224.

4. Influencia de dextranos como aditivos modificadores del biocatalizador en la esterificación del ácido (*R,S*) 2-(4-isobutil)-fenil propanoico con n-propanol.

Como ya se comentó en la *Introducción* de esta Memoria, el estudio y control del grado de hidratación del microentorno del biocatalizador nos ha llevado a analizar la influencia de la modificación de la superficie de la enzima a través de dextranos, tanto por modificación covalente como no covalente. Ello permitiría comprobar cómo afectaba al balance hidrofóbico/hidrofílico la manipulación del microentorno del biocatalizador. La presencia de estos carbohidratos macromoleculares debería alterar el contenido de agua asociado a la superficie de la enzima. Esto se comprobó al analizar las isotermas de adsorción y sorción de agua (Figura IV.27 y Figura IV.38, respectivamente).

4.1. Empleo de biocatalizadores modificados por unión no covalente.

Los derivados modificados se obtuvieron a partir de las lipasas semipurificadas (ver *Parte experimental*). Se utilizó como reacción test la esterificación del (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico estudiando la influencia de la modificación en la conversión a ester del (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico y en la enantioselectividad, al estudiar el exceso enantiomérico del ácido remanente que no ha sido esterificado.

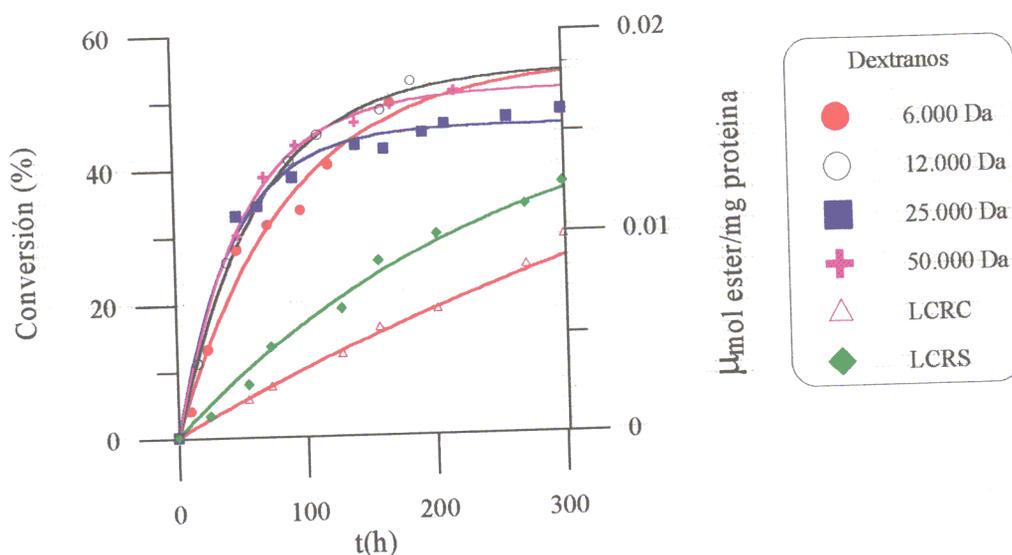
Se prepararon diversos complejos dextrano/lipasa que se muestran en la Tabla IV.11. En la Sección IV.1.E se abordaron los aspectos estructurales pasándose ahora a evaluar su actividad en la reacción de esterificación.

Influencia del peso molecular del dextrano en la actividad catalítica.

La reacción de esterificación del (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico se empleó como reacción test para analizar la actividad catalítica de los biocatalizadores obtenidos con dextranos de diferente peso molecular. Los resultados se compararon con los procedentes de la misma reacción catalizada por la preparación comercial (LCRC) y la lipasa semipurificada (LCRS) de *Candida rugosa*. En todos los casos puede comprobarse que el complejo enzima/dextrano es más activo que las preparaciones LCRC y LCRS. En las Figuras IV.51, IV.52 y IV.53 se presentan los perfiles de las curvas de actividad de un preparado enzima/dextrano (40/10) con dextranos de diferente peso molecular, en las que se representa la velocidad en $\mu\text{moles de ester/mg de proteína/h}$, comprobando que la velocidad inicial es mayor cuando aumenta el contenido de agua del sistema.

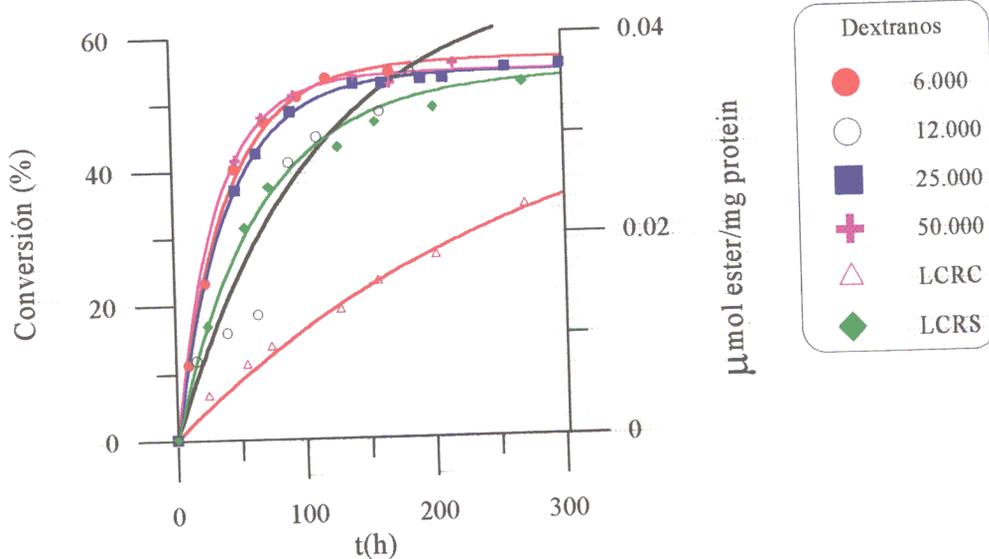
Los datos mostrados en la Figura IV.51 corresponden a unas condiciones en las que se quiere comprobar el efecto que ejerce el peso molecular del dextrano a una concentración de agua que corresponde a 5 μl de agua/mg de preparado, los perfiles de las curvas de LCRC y LCRS, están por debajo de los que corresponden a los derivados modificados y entre estos últimos la velocidad inicial de reacción es algo superior cuando se emplean dextranos de alto peso molecular como 50 KDa ($v = 0,6$ mmoles de ester convertidos/h) respecto a la utilización de derivados modificados con dextranos de 6 KDa ($v = 0,4$ mmoles de ester convertidos/h).

Figura IV.51. Esterificación de (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico con n-propanol; 40 mg de preparado modificado LCRC/dextrano (40/10 p/p) con dextranos de diferentes pesos moleculares. Adición de 5 μ l de agua/mg de preparado.



Esto es debido a que la naturaleza poliólica del polímero de mayor peso molecular le capacita para de retener mayor número de moléculas de agua en el microentorno de la proteína.

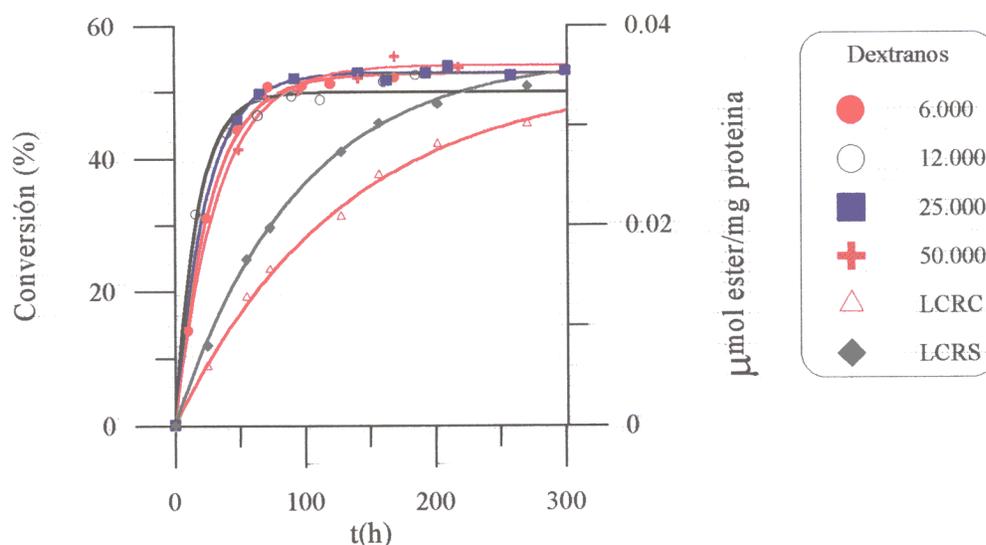
Figura IV.52. Esterificación de (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico con n-propanol; 40 mg de preparado modificado LCRC/dextrano (40/10 p/p) con dextranos de diferentes pesos moleculares. Adición de 10 μ l de agua/mg de preparado.



Cuando se añaden 10 μ l de agua por mg de preparado enzimático (Figura IV.52), vemos que la actividad aumenta la velocidad inicial de esterificación. La diferencia entre los preparados

son menores como se comprueba al comparar la velocidad del derivado formado por dextranos de 50 KDa ($v = 1,1$ mmoles de ester convertidos/h) con la del derivado formado por dextranos de 6 KDa ($v = 0,89$ mmoles de ester convertidos/h). En este caso también la actividad del preparado modificado está relacionada con el peso molecular del polímero y aumenta con el peso molecular del mismo. Con respecto a las enzimas nativas, la LCRS aumenta considerablemente la velocidad con respecto a la variación que sufre la LCRC. Debido a que el proceso de semipurificación a través de la diálisis y posterior liofilización, ha eliminado la lactosa que, en el preparado comercial favorecen la retención de moléculas de agua en la superficie de la proteína. Por esta razón el aumento en la adición de moléculas de agua por mg de preparado favorece mucho más la velocidad de LCRS.

Figura IV.53. Esterificación de (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico con n-propanol; 40 mg de preparado modificado LCRC/dextrano (40/10 p/p) con dextranos de diferentes pesos moleculares. Adición de 50 μ l de agua/mg de preparado.



En la Figura IV.53 se comprueba que apenas hay diferencias significativas en las velocidades iniciales de los derivados modificados con dextranos de diferente peso molecular; esto es debido a la mayor cantidad de agua añadida al medio (50 μ l/mg de preparado). Siempre

las enzimas nativas, LCRC y LCRS, siguen teniendo menor actividad que los derivados modificados.

Con estos resultados se comprueba que la presencia de un polisacárido modificador favorece la obtención de un derivado enzimático más activo que las correspondientes enzimas nativas de las que procede; y sobre todo, la importante influencia del contenido en agua presente en el medio de reacción sobre la actividad catalítica de cada preparado. Por esta razón se realizó un estudio sobre la influencia que tenía en la velocidad inicial de la reacción la cantidad de agua añadida al medio.

Influencia de la cantidad de agua añadida en la velocidad inicial al variar la relación enzima/dextrano.

En la Tabla IV.33 se muestran los valores de velocidades iniciales de reacción de cada uno de los derivados ensayados en mmoles de ester/h.

Como se ha podido comprobar hasta ahora a través de los resultados expuestos, la modificación no covalente con dextranos provoca una alteración en la hidratación del microentorno de la proteína que a su vez puede modularse variando la cantidad de agua presente en el medio de reacción en el tiempo inicial. En todos los casos estudiados se ha comprobado que añadiendo 50 μ l de agua por mg de preparado se obtiene generalmente el biocatalizador más activo ya que se cuenta con la cantidad de agua necesaria para el biocatalizador esté totalmente hidratado y se potencia su actividad catalítica. Esto queda corroborado cuando se añade al medio tan sólo 5 μ l de agua por mg de preparado, donde la hidratación tanto para la enzima, como para el dextrano y el disolvente es insuficiente y en consecuencia el biocatalizador es menos activo.

Tabla IV.33. Velocidades iniciales de reacción de cada uno de los derivados ensayados (mmoles de ester/hora). Condiciones de reacción: [ácido]=[alcohol]=66mM, 40 mg de preparado, 10 ml de isooctano, 30 °C, 500 r.p.m.

Dextrano	Relación	5 µl agua	10 µl agua	50 µl agua
	LCRS/dextrano			
6 KDa	40/10	0,443	0,897	1,267
	40/20	0,746	0,836	1,27
	40/30	0,395	0,37	0,276
12 KDa	40/10	0,551	0,61	1,957
	40/20	0,155	0,658	0,509
	40/30	0,357	0,587	0,936
25 KDa	40/5	0,128	0,7	1,018
	40/10	0,676	0,87	1,554
	40/20	0,216	0,389	0,68
50 KDa	40/5	0,268	1,351	1,279
	40/10	0,666	1,107	1,187
	40/15	0,446	0,71	1,288

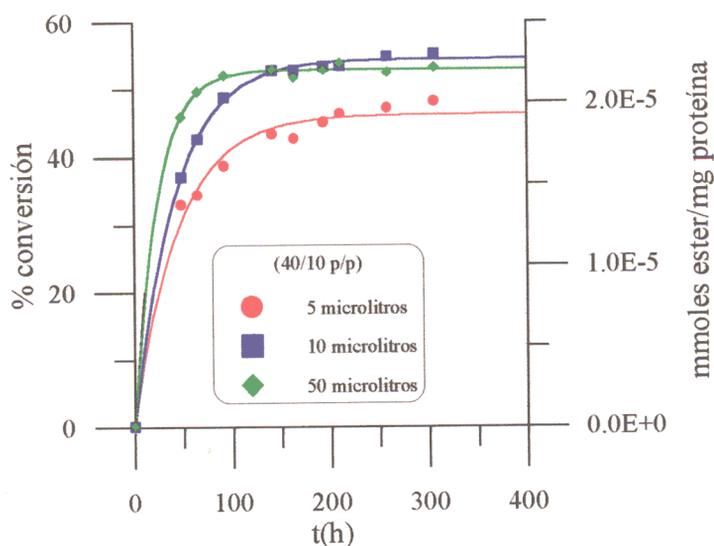
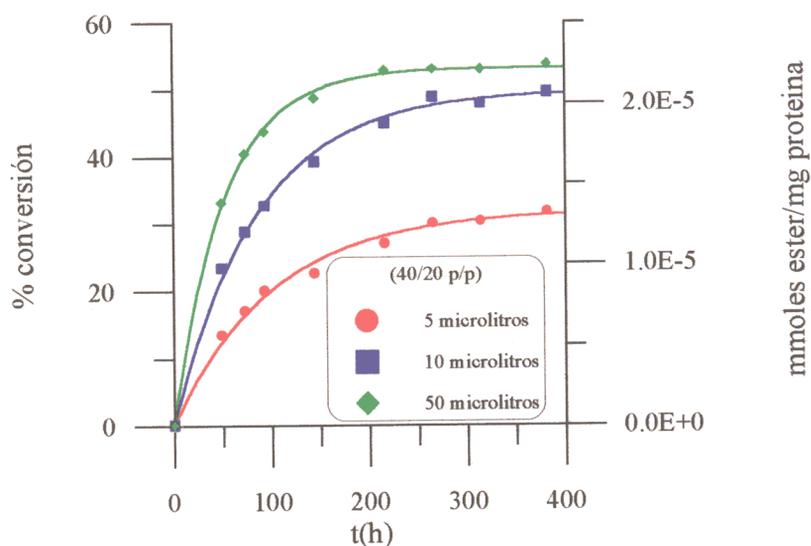
La velocidad inicial de esterificación varía en función del peso molecular del dextrano y su porcentaje en el biocatalizador, comportándose de manera diferente frente a la adición del agua. Todo ello nos lleva a concluir que la presencia de este hidrato de carbono afecta al microentorno del catalizador.

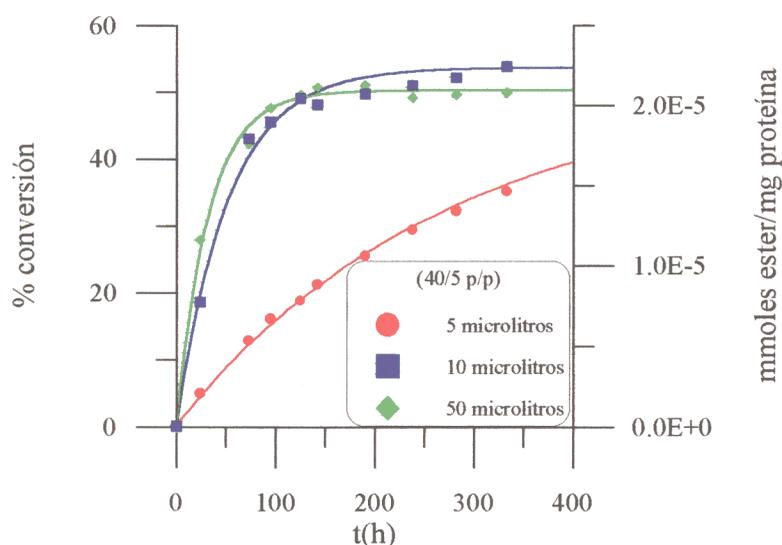
Así mismo, cabe decir, que el efecto de la adición del agua es más notable cuando se utilizan dextranos de bajo peso molecular debido, probablemente a la distribución que sufre el agua entre el sistema dextrano liofilizado y la enzima liofilizada. Por el contrario, el efecto del agua, sobre todo en proporciones elevadas, no es tan positivo para el dextrano de alto peso molecular (50 KDa), posiblemente a que puede actuar como captor de moléculas de agua

evitando la hidratación de la enzima, provocando en consecuencia pequeñas variaciones en las velocidades iniciales de reacción.

Estos resultados se deben a que el dextrano liofilizado tiene naturaleza hidrófila y tiene afección por el agua. En el caso de que este agua fuese insuficiente para hidratarlo llegaría en menor medida a la enzima, ya que es menos hidrófila que el dextrano, provocaría un descenso de la actividad enzimática debido al bajo estado de hidratación.

Figura IV.54. Esterificación de ácido R,S 2-(4-isobutil) fenil propanoico. Condiciones de reacción: [ácido] = [alcohol] = 66mM; 40 mg de biocatalizador (25 KDa) con diferentes cantidades de agua. Figura a: (40/20 p/p). Figura b: (40/10 p/p). Figura c: (40/5 p/p).





A modo de ejemplo en la Figura IV.54, se muestra el caso de uno de los preparados, en este caso modificado con dextranos de 25 KDa, en los que se han ensayado las relaciones LCRS/dextrano 40/20, 40/10 y 40/5, con las diferentes cantidades de agua añadidas al medio (5, 10 y 50 μ l de agua por mg de preparado).

En general puede observarse un efecto positivo sobre la actividad enzimática de la adición de agua, en especial sobre aquellos catalizadores cuya proporción de dextrano es baja (relación 40/5, 40/10 (p/p)). Por el contrario, a elevadas relaciones de dextrano el efecto del agua es mínimo o contraproducente.

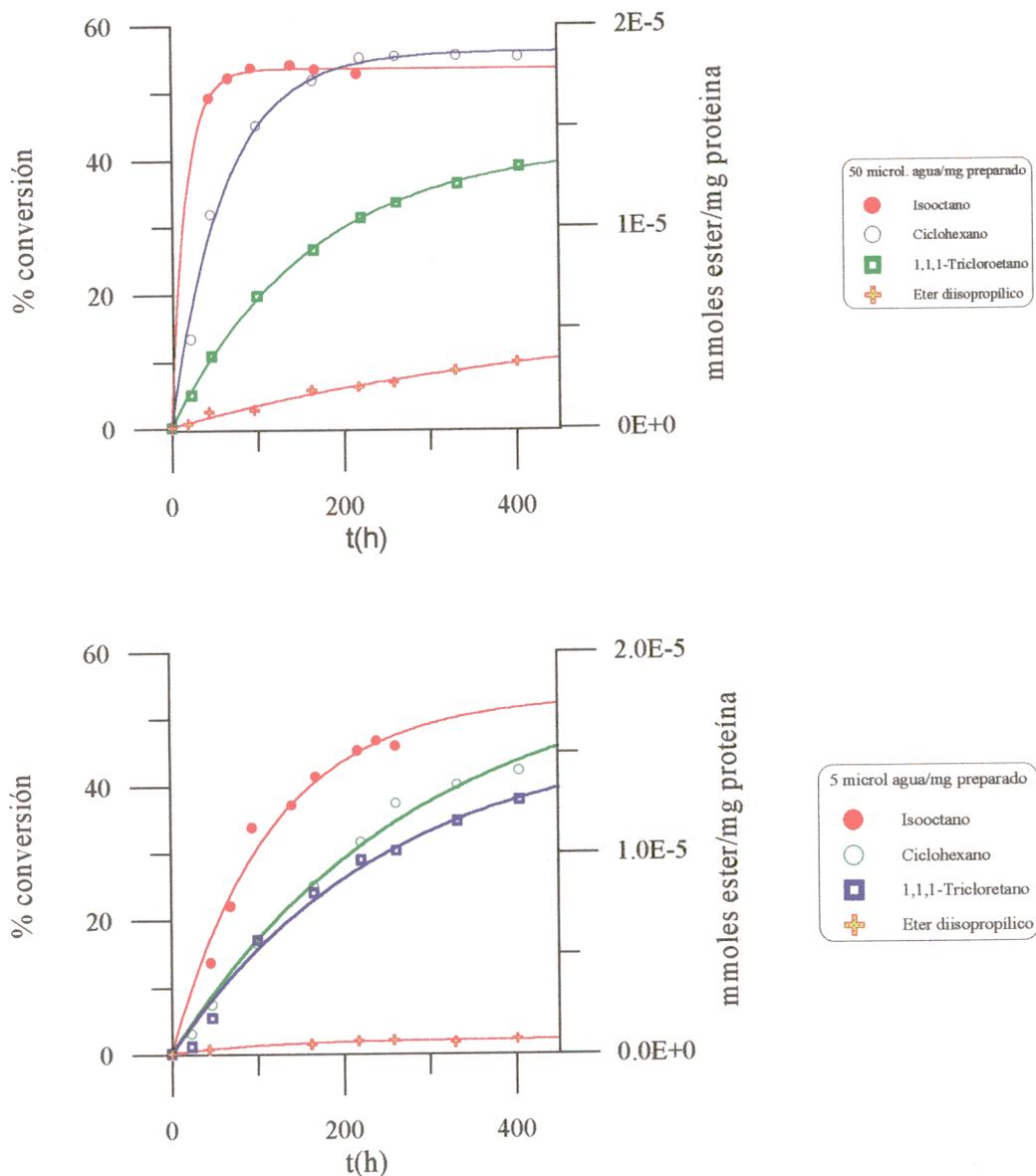
Esto se indica en las Figuras b y c, con dextranos de 25KDa pero con una menor relación LCRS/dextrano (40/10 p/p y 40/5 p/p, respectivamente) donde el biocatalizador se rehidrata con 10 y 50 μ l de agua obteniéndose el mismo rendimiento. Con todo ello se puede afirmar que el dextrano contribuye a aumentar las características hidrofílicas de la superficie de la lipasa favoreciendo su actividad catalítica.

Influencia del log P del disolvente.

Como se ha podido comprobar a partir de las isotermas de adsorción de los preparados enzimáticos en el seno de diferentes disolventes (Figura IV.28), el log P del medio orgánico, referencia clara de la polaridad de un disolvente, influye en el valor de a_w de preequilibrio de biocatalizador y medio para lograr la máxima actividad. Esto es debido a que el disolvente también entra en una competencia junto con la enzima, reactivos y otros componentes de la reacción por las moléculas de agua presentes en el medio. Los disolventes hidrofóbicos necesitan un menor valor de a_w de preequilibrio ya que no tienen afinidad por el agua y no entran en competencia por las moléculas de agua con la enzima, dejando que éstas entren a formar parte de la capa de hidratación que requiere la proteína liofilizada para ser catalíticamente activa. A continuación en la Figura IV.55 se muestran los resultados obtenidos en la esterificación del ácido (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico con n-propanol en una serie de disolventes orgánicos de diferente hidrofobicidad utilizando como catalizador un derivado modificado con dextranos de 50 KDa de peso molecular, de relación LCRS/dextrano 40/5 en los que también se ha estudiado la influencia de la adición de agua al medio. Se emplearon disolventes con diferente log P, ya que este parámetro proporciona una información adecuada de la polaridad del medio y su repercusión en la actividad enzimática.²⁷⁷

²⁷⁷ Reslow, M.; Adlercreutz, P. y Mattiasson, B. (1987) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 1-8.

Figura IV.55. Esterificación de (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico con n-propanol. Condiciones de reacción: [ácido] = [alcohol] = 66 mM, 40 mg de preparado LCRS/dextrano (50 Kda) (40/5 p/p) en diferentes disolventes, volumen final 10 ml, 30 °C, agitación 500 rpm. Figura a: 50 μ l de agua por mg de preparado. Figura b: 5 μ l de agua por mg de preparado.



En cualquier caso el complejo enzimático es más activo en presencia de disolventes orgánicos como isooctano ($\log P = 5,18$) o ciclohexano ($\log P = 3,44$) que con disolventes con carácter más hidrofílico del tipo del 1,1,1-tricloroetano ($\log P = 2,49$) o éter diisopropílico ($\log P = 1,52$). Por tanto, con disolventes hidrófobos se alcanza el máximo de reacción antes que con

disolventes hidrofílicos. En el caso de los disolventes con cierto carácter polar y con valores de log P inferiores, tienen más afinidad por el agua y en consecuencia compiten por ella con el biocatalizador de manera que la velocidad de la reacción es mucho más lenta y se necesita más tiempo para llegar al máximo de reacción. Igualmente Zaks y Klibanov⁴⁶ confirmaron que para un mismo contenido en agua, la actividad enzimática en disolventes hidrófobos era mayor que la obtenida con disolventes hidrofílicos debido a que los primeros facilitan más agua a la enzima para su función catalítica.

También podemos comprobar el efecto que tiene el agua añadida al medio de reacción de manera que afecta considerablemente a la velocidad inicial de reacción pero no en el rendimiento final. Esto se debe a que la cantidad de 5 μ l de agua por mg de biocatalizador no es cantidad suficiente para la total hidratación del biocatalizador y sólo unas moléculas de proteína son activas a tiempos de reacción cortos, esto no ocurre cuando se añaden 50 μ l de agua por mg de biocatalizador, ya que todas las moléculas de proteína están hidratadas de manera que el complejo enzima/dextrano (LCRm) es catalíticamente activo. Si comparamos los valores de conversión obtenidos con los de la lipasa sin modificar (Tabla IV.22), vemos que logramos en menor tiempo mayores valores de conversión en ester. Así mismo cabe indicar que la presencia de los dextranos vuelve a los biocatalizadores mucho más estereoselectivos, ya que nunca supera el 50 % de conversión (Figura IV.55). Este efecto es similar al que se observaba al añadir agua al medio en el caso de la esterificación del (*R*) o (*S*) 2-(3'-benzoilfenil) propanoico (Tabla IV.30), lo cual nos confirma la hidratación del microentorno de la enzima por efecto del polisacárido que retiene agua. Conclusiones y explicaciones análogas para el incremento de la actividad observado

⁴⁶ Zaks, A. y Klibanov, A.M. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 8017-8021.

con α -quimotripsina y lipasa comercial de *Candida rugosa* modificada con sucrosa han sido indicadas por Longo y Combes¹⁶⁶ y por Adlercreutz²³⁵ para la α -quimotripsina modificada con sorbitol.

Para observar la influencia de la adición de agua al medio en la velocidad inicial de la reacción de esterificación v_o (mM/hora/mg de preparado) en la Tabla IV.33 se representan los valores cuando se añaden 5 y 50 μ l de agua usando dextranos con diferente peso molecular y empleando la misma proporción LCRS/dextrano (40/10 p/p).

Tabla IV.33. Influencia de la cantidad de agua añadida en v_o (mM/hora) de esterificación de (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico. Relación LCRS/dextrano (40/10).

Dextranos (Pm)	v_o (50 μ l)	v_o (5 μ l)	$[(v_o(50\mu l)-v_o(5\mu l))/v_o(5\mu l)] \times 100$
6KDa	1,92	0,64	181,8
12KDa	2,91	0,85	269,2
25KDa	2,24	1,02	137,5
50KDa	1,65	1,65	81,25
LCRS	0,21	0,59	-64
LCRC	0,12	0,4	-70

En las condiciones de reacción diseñadas, la actividad sintética de LCRS es mayor que en LCRC. Esto coincide con los resultados obtenidos por Hernáiz y col.¹⁹⁰ en la hidrólisis enantioselectiva de (*R,S*) 2-aril propanoatos de etilo, catalizada por LCRC y LCRS.

Podemos observar que la adición de agua a LCRC y LCRS, enzimas nativas, provoca una disminución de la velocidad de esterificación, debido a que con una adición de 50 μ l de agua/mg de preparado hay un exceso en el medio de reacción que hace que se favorezca la hidrólisis sobre

¹⁶⁶ Longo, M.A. y Combes, D. (1997) *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2**, 281-289.

²³⁵ Adlercreutz, P. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1163**, 144-148.

¹⁹⁰ Hernáiz, M.J.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1994) *Tetrahedron*, **50**, 10749-10760.

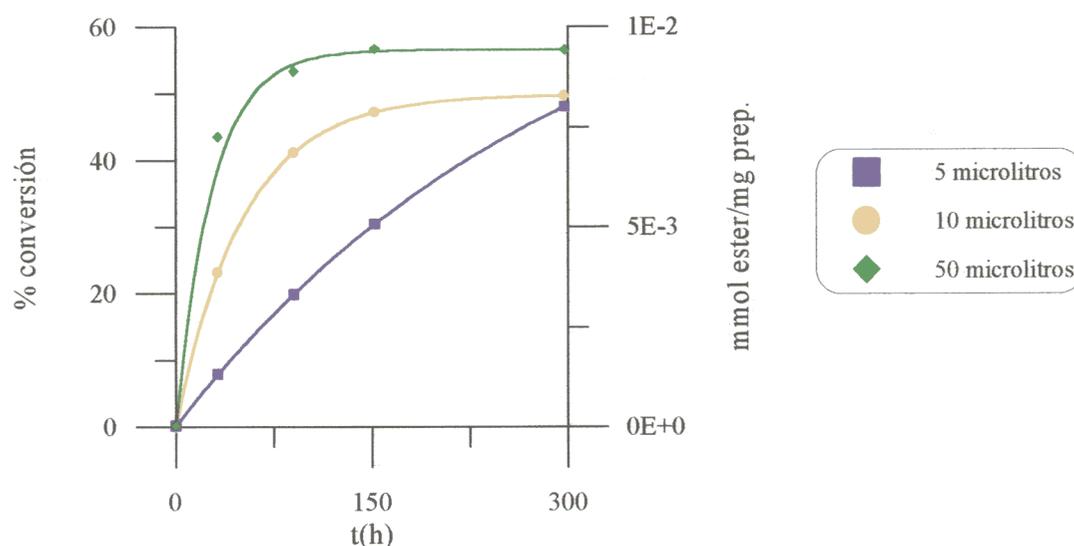
la formación del ester. Por el contrario, la presencia de dextranos en el derivado modificado anula este efecto negativo, debido probablemente a que las moléculas de dextrano liofilizadas son capaces de adsorber el exceso de agua en el medio favoreciendo la reacción de esterificación, al evitar las condiciones óptimas para la hidrólisis.

Así mismo también se estudió la influencia que ejerce la modificación por unión no covalente de dextrano sobre la actividad catalítica de una preparación semipurificada de UAB (UABS/dextrano) a la que se denominó *UABm*. Las condiciones experimentales y de preparación han sido las mismas que las descritas para la modificación no covalente de la LCRC. La reacción test empleada fue la esterificación de (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico con n-propanol en isooctano empleando para ello dextranos de diferente peso molecular; se utilizó como catalizador de la reacción un preparado constituido por una relación UABS/dextrano (40/10). Se escogió esta relación debido a que representaba la presencia de dextranos en la esterificación de la reacción estudiada y la influencia de la cantidad de agua añadida al medio. Se añadieron diferentes cantidades de agua, 5, 10 y 50 μl de agua/mg de preparado enzimático, para poder analizar la influencia que tenía el grado de hidratación del preparado enzimático sobre la actividad catalítica de la enzima, y comparar los resultados con los obtenidos cuando se empleó como catalizador la preparación LCRS/dextrano (LCRm).

En la Figura IV.56 representamos los valores de conversión en ester de (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico a lo largo de 300 h de reacción empleando como catalizador una preparación *UABm* constituida por una relación UABS/dextrano (40/10) con dextranos de 6 KDa y con diferentes cantidades de agua añadida al medio. Podemos ver la influencia del estado de hidratación en la velocidad de la reacción, comprobando que a mayor contenido de agua en el medio, la velocidad aumenta y se llega antes al máximo de conversión con 50 μl de agua/mg de

preparado que con 10 μl de agua/mg de preparado. Esto es debido a que el derivado modificado requiere de una cantidad de agua necesaria para hidratar a la preparación enzimática liofilizada UABS y al dextrano, también liofilizado que, además dada su naturaleza poliólica, presenta también avidez por el agua. Por esta razón es importante controlar la cantidad de agua que se añade al medio para obtener la máxima eficacia catalítica. Estos resultados son concordantes con los obtenidos para la síntesis catalizada por la preparación LCRm.

Figura IV.56. Esterificación de (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico con n-propanol en isooctano catalizada por UABm (40/10) con dextranos de 6 KDa, con adición de diferentes cantidades de agua: 5, 10 y 50 μl de agua/mg de preparado.

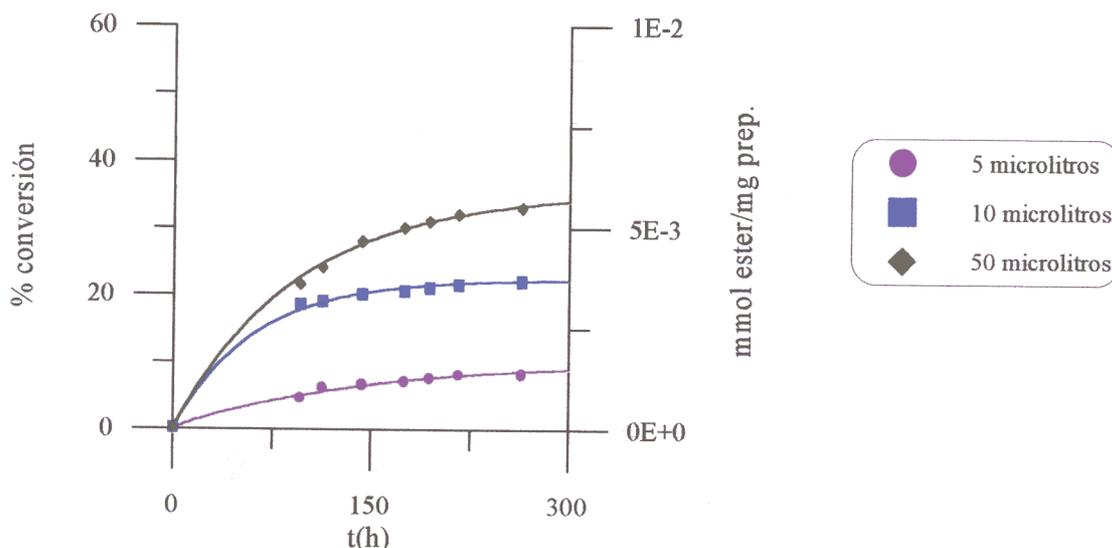


Condiciones de reacción: [ácido] = [alcohol] = 66 mM, 40 mg de preparado UABS/dextrano (6 KDa) (40/10 p/p) en 10 ml de Isooctano con diferentes adiciones de agua: 5, 10 y 50 μl de agua/mg de preparado, 30 $^{\circ}\text{C}$, agitación 500 rpm.

No obstante, si comparamos estos resultados con los del biocatalizador LCRS/dextrano (40/10 p/p 6 KDa; Figuras: IV.51, IV.52 y IV.53), vemos que el derivado modificado obtenido a partir de la lipasa UABS es más sensible a la adición de agua (Figura IV.56) que los que se obtienen a partir de LCRS. Ello pudiera deberse a que el derivado UABM posee un 9,21 % de azúcares, mientras el LCRM tiene un 6,31 % (Tabla IV.13). Así pues, la mayor presencia de

azúcares en el primer caso permite una mayor modulación del grado de hidratación del microentorno, que no se saturaría tan pronto como en el caso de la LCRM.

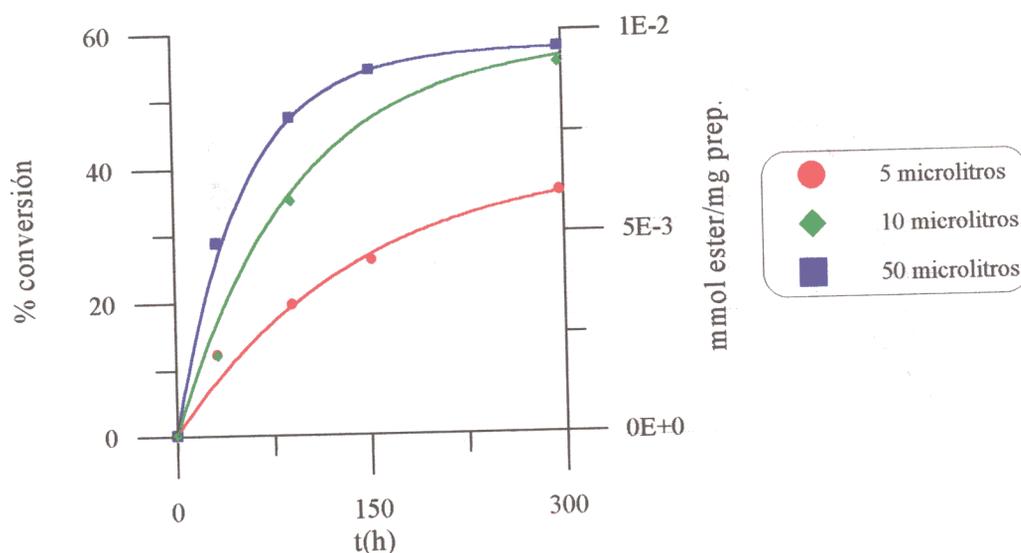
Figura IV.57. Esterificación de (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico con n-propanol en Isooctano catalizada por UABm (40/10) con dextranos de 12 KDa, con adición de diferentes cantidades de agua: 5, 10 y 50 μl de agua/mg de preparado.



Condiciones de reacción: [ácido] = [alcohol] = 66 mM, 40 mg de preparado UABS/dextrano (12 KDa) (40/10 p/p) en 10 ml de Isooctano con diferentes adiciones de agua: 5, 10 y 50 μl de agua/mg de preparado, 30 °C, agitación 500 rpm.

En la Figura IV.57 aparecen los resultados correspondientes a la esterificación empleada como reacción test y con un derivado UABm donde se han utilizado dextranos de 12 KDa; en este caso el porcentaje de conversión alcanzado es inferior al conseguido cuando se utilizaban dextranos de 6 KDa, posiblemente sea debido a que al utilizar un azúcar de mayor peso molecular y en consecuencia con mayor número de grupos -OH, requiera un mayor contenido de agua para hidratar la preparación semipurificada UABS y al carbohidrato añadido como azúcar modificador. Por ello no se alcanzaría la flexibilidad molecular adecuada y el catalizador sólido sería menos activo.

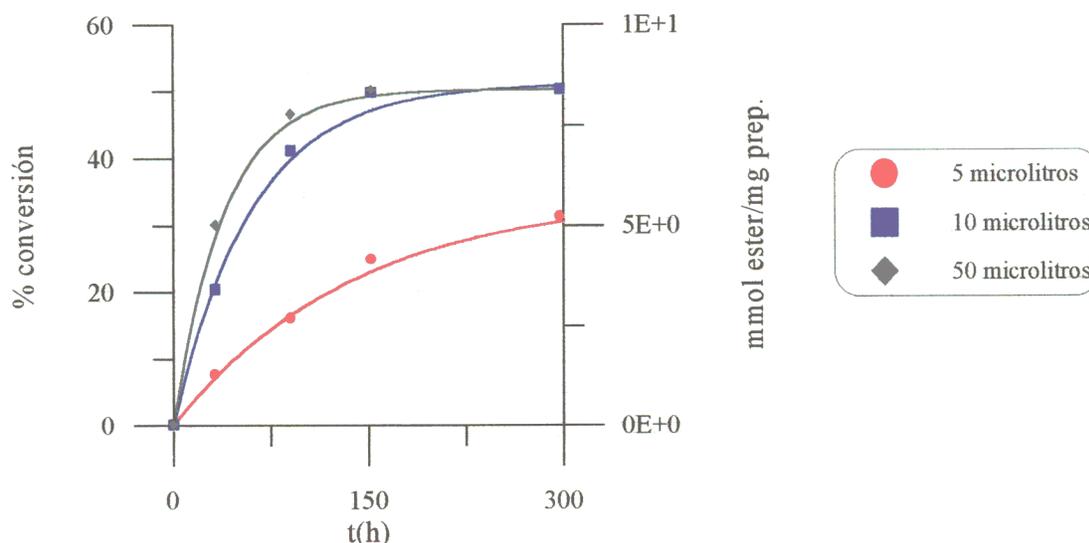
Figura IV.58. Esterificación de *(R,S)* 2-(4-isobutilfenil) propanoico con n-propanol en isooctano catalizada por UABm (40/10) con dextranos de 25 KDa, con adición de diferentes cantidades de agua: 5, 10 y 50 μl de agua/mg de preparado.



Condiciones de reacción: [ácido] = [alcohol] = 66 mM, 40 mg de preparado UABS/dextrano (25 KDa) (40/10 p/p) en 10 ml de isooctano con diferentes adiciones de agua: 5, 10 y 50 μl de agua/mg de preparado, 30 °C, agitación 500 rpm.

En la Figura IV.58 se presentan los resultados correspondientes a la conversión obtenida cuando se emplean dextranos de 25 KDa. Sigue manteniéndose la influencia del contenido en agua de la reacción, alcanzando una mayor conversión en éster del *(R,S)* 2-(4-isobutilfenil) propanoico cuando se emplean mayores cantidades de agua, con 50 μl de agua/mg de preparado la velocidad de la reacción es mayor que con 5 μl de agua/mg de preparado. En este caso comprobamos que los perfiles de las curvas de 10 y 50 μl de agua/mg de preparado están muy cercanas, posiblemente debido a que la estructura polimérica del azúcar estabiliza la conformación de la enzima, favoreciendo la actividad. Así pues, la actividad relativa alcanzada depende del peso molecular del dextrano y de la actividad de agua, pero siempre se puede llegar a mejorar los resultados obtenidos sólo con agua (Tabla IV.30).

Figura IV.59. Esterificación de (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico con n-propanol en isoctano catalizada por UABm (40/10) con dextranos de 50 KDa, con adición de diferentes cantidades de agua: 5, 10 y 50 μ l de agua/mg de preparado.



Condiciones de reacción: [ácido] = [alcohol] = 66 mM, 40 mg de preparado UABS/dextrano (50 KDa) (40/10 p/p) en 10 ml de Isooctano con diferentes adiciones de agua: 5, 10 y 50 μ l de agua/mg de preparado, 30 °C, agitación 500 rpm.

En la Figura IV.59 observamos que cuando se emplean dextranos de alto peso molecular como 50 KDa, la naturaleza poliólica del azúcar favorece la captación de moléculas de agua alrededor de la proteína y esto desemboca en una mayor actividad catalítica como se demuestra en el hecho de que en este caso el porcentaje de éster obtenido es mayor que en los casos anteriores. Es importante comentar que el perfil de la curva correspondiente a la adición de 10 μ l de agua/mg de preparado está muy cerca del correspondiente a la adición de 50 μ l de agua/mg de preparado. Este hecho indica que el tamaño del azúcar ejerce una gran influencia en la formación de interacciones no covalentes con la proteína que se traduce en un aumento de la eficiencia catalítica.

Para estudiar la influencia del contenido de agua añadido al medio de reacción en la Tabla IV.34 se muestran las velocidades iniciales de reacción expresadas como mmoles de éster de

(*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico convertidos por mg de preparado enzimático en una hora.

Tabla IV.34. Influencia de la cantidad de agua añadida en v_o (mmoles ester/mg preparado/hora) en la esterificación de (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propanoico con *n*-propanol en Isooctano con un preparado UABm con dextranos de diferente peso molecular. Relación UABS/dextrano (40/10).

Dextranos (Pm)	v_o (mmoles ester/mg preparado/h)		
	5 μ l agua/mg prep.	10 μ l agua/mg prep.	50 μ l agua/mg prep.
6.000 Da	0,254	0,962	1,03
12.000 Da	0,069	0,362	0,372
25.000 Da	0,29	0,628	1,088
50.000 Da	0,38	0,848	1,287
UAB ^a	$7 \cdot 10^{-3}$	0,049	0,123

^a Preparación nativa sin modificar.

Podemos observar que la mayor velocidad de reacción independientemente del peso molecular del dextrano se presenta cuando se añaden 50 μ l de agua/mg de preparado. La velocidad inicial con dextranos de 6 KDa es superior que con 12 KDa. Cuando el peso molecular del carbohidrato aumenta la v_o también lo hace, salvo en el caso de los dextranos de 12 KDa, donde posiblemente la presencia del azúcar no ha conseguido estabilizar la estructura de la proteína. Cuando se emplean dextranos de 25 KDa, la v_o es mayor cuando se añaden 50 μ l de agua/mg de preparado debido a que ésta es la cantidad de agua necesaria para hidratar el derivado modificado. Lo mismo ocurre en el caso de trabajar con dextranos de 50 KDa donde la v_o con 10 y 50 μ l de agua/mg de preparado son de las más elevadas. Esto implica un comportamiento semejante al del preparado LCRm, donde la presencia de un azúcar modificador favorece la obtención de un derivado enzimático mas estable y activo. En este caso la mayor velocidad (v_o) se alcanza con el preparado UABm constituido con los dextranos de 50 KDa, esto está relacionado por la estructura de la lipasa UABS, a partir de la cual se prepara la modificación y que procede de una diálisis con posterior liofilización tal y como se indicó en la *Parte*

experimental, lo que hace que este preparado tenga mayor actividad cuando está presente un estructura polimérica caracterizada por la gran cantidad de grupos -OH que, tiene facilidad por ligar moléculas de agua alrededor de la enzima y de esta manera estabilizar la estructura proteica; además el azúcar modificador tiene también la capacidad de formar enlaces no covalentes que ayudan igualmente a la estabilización de la estructura. Finalmente se puede comprobar el aumento en la velocidad inicial experimentado por la preparación UAB cuando está modificada por unión no covalente en relación al estado nativo. Independientemente de la cantidad de agua añadida a la preparación UAB, las velocidades iniciales son inferiores en todos los casos respecto a las preparaciones modificadas UABS/dextrano. Si bien, en el caso de la UAB la velocidad inicial aumenta con la adición de agua, no se llega a la misma magnitud que en el caso de las preparaciones modificadas. De lo anteriormente visto se desprende que para encontrar las condiciones adecuadas es necesario llegar a la relación adecuada entre grupos -OH dado por el tamaño (peso molecular) y el contenido en agua dado por la isoterma de sorción²⁷⁸ (de biocatalizador en disolvente), para que la proteína no tenga exceso ni defecto en agua.

La diferente composición en isoenzimas de la lipasa UAB y de la LCRC (Tabla IV.6) pudiera ser la causa de la distinta gradación de actividades observada en las Tablas IV.32 (LCRm) y Tabla IV.34 (UABm) cuando la modificación se hace con dextranos de distinto peso molecular y la misma cantidad de agua añadida. Este es un punto a estudiar en el futuro. Lo que sí que es un hecho es que la actividad sintetasa aumenta con el agua añadida al biocatalizador liofilizado y modificado. Este pauta ha de atribuirse al comportamiento del dextrano liofilizado frente al agua.

²⁷⁸ Sánchez-Montero, J.M.; De la Casa, R.M. y Sinisterra, J.V. (1998) En *Stability and Stabilization of Biocatalysts*. p: 453-458. Ed.: Ballesteros, A.; Plou, F.J.; Iborra, J.L. y Halling, P.J. Elsevier Sc. B.V.

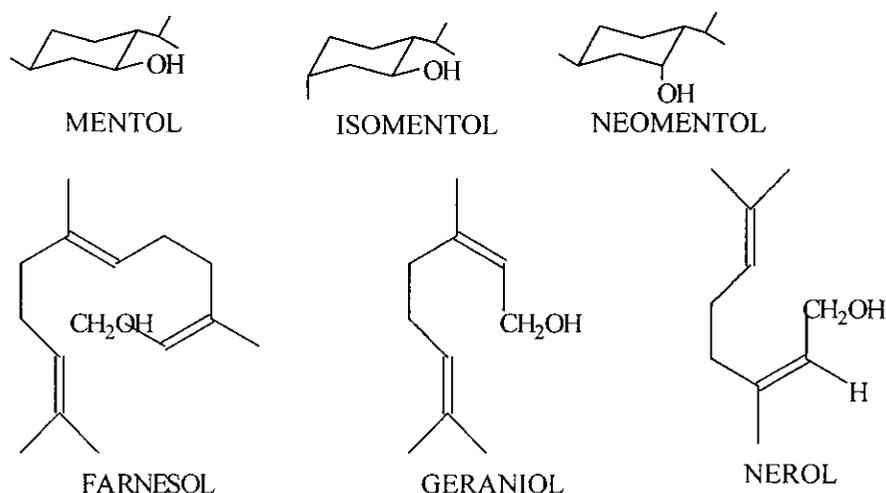
4.2. Empleo de biocatalizadores modificados por unión covalente.

Como se indicó en la *Parte experimental* también se prepararon derivados que fueron modificados a través de una reacción química que provocaba la formación de un enlace covalente. En la Tabla IV.13 se compararon los dos derivados obtenidos al modificar la LCRS y la UABS. La mayor modificación observada en el caso de la lipasa UAB (UABM: 9,2 %), frente al obtenido para la lipasa LCRS (LCRM: 6,3 %) explica la mayor estabilización observada en el primer caso que en el segundo (Tabla IV.14).

Dados los buenos resultados obtenidos en el caso de la esterificación con los catalizadores modificados de manera no covalente, decidimos emplear estos catalizadores en la transesterificación de alcoholes, donde aquellos dieron pobres resultados, los cuales no han sido reflejados en esta Memoria.

3.2. Influencia del estado y origen del biocatalizador en la transesterificación de terpenos.

Se emplearon tres alcoholes primarios: geraniol, nerol y farnesol, y tres alcoholes secundarios: mentol, isomentol y neomentol.

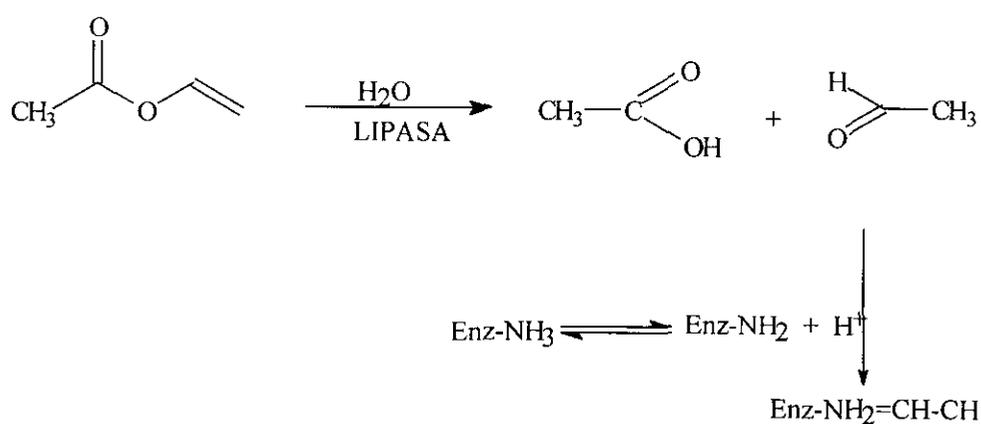


Este estudio permitía ver si la naturaleza del alcohol y el impedimento estérico en torno al grupo -OH afectaba a la actividad catalítica, comparando la actividad de la lipasa comercial de *Candida rugosa* (LCRC) y de la lipasa obtenida del control de las condiciones de fermentación (UAB) con las lipasas procedentes de una modificación covalente de la lipasa comercial y de la UAB con dextranos de 6 KDa (LCRM y UABM). Las condiciones experimentales de reacción fueron descritas en la Sección correspondiente (III.2.4.2.). Los mismos procedimientos experimentales se siguieron para la reacción en blanco en ausencia de enzima, ya que podía haber un cierto grado de transesterificación química. La reacción se llevó a cabo en hexano pues era el disolvente que podía disolver a todos los reactivos.

Los resultados obtenidos con la lipasa comercial se muestran en la Figura IV.60. Puede

observarse, que la conversión obtenida depende de la estructura química del alcohol terpénico.

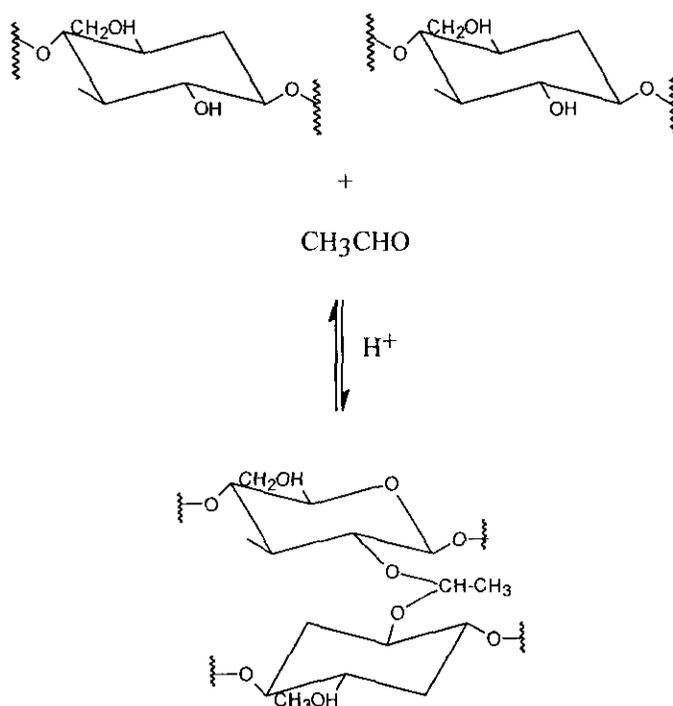
El valor constante de conversión alcanzado después de las 48 h debe atribuirse a una desactivación del biocatalizador por el medio o el reactivo químico (alcohol terpénico o acetato de vinilo). La reacción parásita sería el alcohol vinílico que tautomerizaría a acetaldehído reaccionando con las lisinas libres y modificando por tanto el balance hidrofilia/hidrofobia de la superficie, tan importante para la actividad catalítica como hemos puesto de manifiesto en esta Memoria.



Esta reacción ha sido descrita por numerosos autores siendo relativamente el trabajo de Weber y col.²⁷⁹ el que indica que la lipasa de *Candida rugosa* es de las lipasa más sensibles a este tipo de desactivación.

²⁷⁹ Weber, H.K.; Zuegg, J.; Faber, K. y Pleiss, J. (1997) *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **3**, 131-8.

La otra posibilidad sería la reacción del acetaldehído formado, con los hidroxilos del dextrano catalizado por el acético formado:



Esta reacción también provocaría obviamente una variación en el balance hidrofilia/hidrofobia de la superficie tan importante en el proceso de síntesis enzimática.

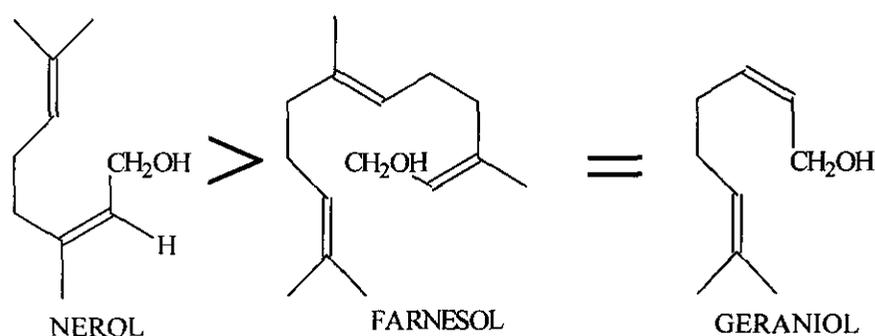
Ambas reacciones serían tanto más importantes cuanto menos reactivo sea el alcohol. Es por ello por lo que las conversiones con los alcoholes secundarios son menores que con los primarios.

De los resultados de la Figura IV.60 podemos deducir que la lipasa de *Candida rugosa* (LCRC) cataliza la esterificación de los alcoholes primarios terpénicos con una velocidad semejante, independientemente de si el doble enlace C_2-C_3 posee configuración Z (Nerol) o E (Geraniol). El farnesol, de mayor tamaño molecular pero de igual configuración en $\text{C}_2=\text{C}_3$ que el Geraniol es esterificado más lentamente.

Los menores rendimientos obtenidos por nosotros respecto a los descritos en la bibliografía²⁸⁰ debe atribuirse a que estos autores trabajan con ácidos de mayor tamaño molecular que el acético y éste es un parámetro fundamental.

Por último, por lo que se refiere a los alcoholes secundarios solamente el mentol da una conversión apreciable ($\approx 15\%$). Este valor es inferior a los descritos por Wu y col.²⁴² y Kawamoto y Tanaka²⁸¹ para las lipasas de *Candida rugosa* de Amano (AY-30) (64% a las 48 h).

Centrándonos en las conversiones finales obtenidas tenemos que la actividad catalítica observada de los terpenos estudiados es:



De ello deducimos una mayor selectividad de la lipasa cruda de *Candida rugosa* (LCRC) hacia la configuración *Z* (Nerol) que hacia la configuración *E* (Geraniol).

Por último, el tamaño de la cadena isoprénica disminuye la conversión obtenida, quizá por impedimento estérico o por problemas difusionales.

Por lo que se refiere a los alcoholes terpénicos secundarios, tenemos que se esterifican

²⁸⁰ a) Karra-Chaabouni, M.; Pulvin, S.; Touraud, D. y Thomas, D. (1998) *J. Am. Oil Soc.*, **75**, 1201-6.
 b) Yee, L.N.; Akoh, C.C. y Phillips, R.S. (1995) *Biotechnol. Lett.*, **17**, 67-70.
 c) Ogutinen, G.B.; Anderson, W.A. y McYoung, M. *Biotechnol. Lett.*, **17**, 77-82.

²⁴² Wu, W.-H., Akoh, C. y Phillips, R. (1996) *Enzyme Microb. Technol.*, **18**, 536-539.

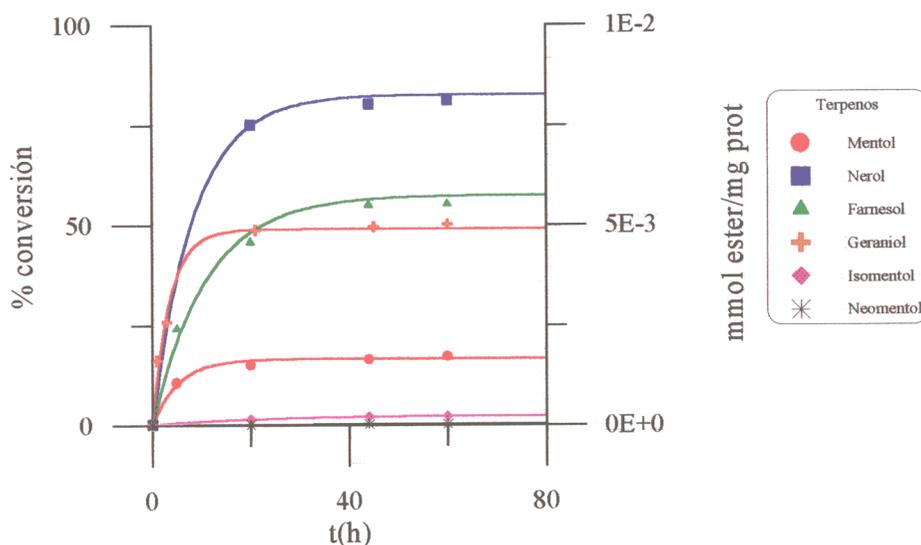
²⁸¹ Kawamoto, T. y Tanaka, A. (1995) *Appl. Microbial Technol. Biotechnol.*, **43**, 639-643.

más lentamente que los secundarios, como cabía de esperar, con un orden de reactividad relativo:



Estos resultados coinciden con los descritos en la bibliografía por Wu y col.²⁴² y Kawamoto y Tanaka²⁸¹ para las lipasas de *Candida rugosa* de Amano.

Figura IV.60. Reacción de esterificación de terpenos catalizada por LCRC. Condiciones de reacción: terpeno 0,1 M; acetato de vinilo 0,1 M; 30 °C, 500 rpm, volumen final 10 ml de hexano.



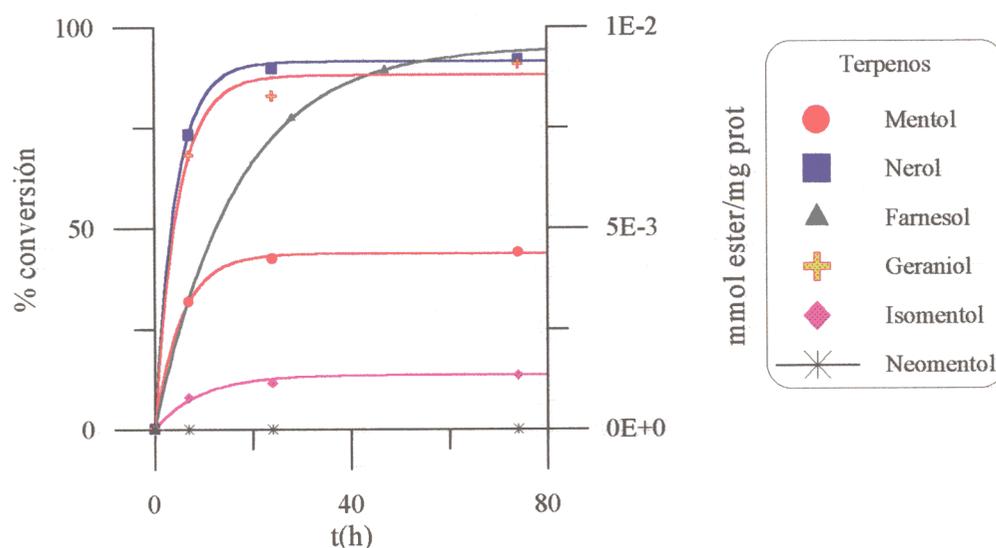
Cuando los mismos alcoholes terpénicos se esterificaron con la lipasa UAB (cuya composición y proporción relativa de isoformas era diferente de la lipasa cruda de SIGMA) se obtuvieron los resultados de la Figura IV.61.

Puede apreciarse que la gradación relativa de velocidades iniciales es semejante al caso de la lipasa de Sigma: $V_{o(Nerol)} \approx V_{o(Geraniol)} > V_{o(Farnesol)}$.

²⁴² Wu, W.-H., Akoh, C. y Phillips, R. (1996) *Enzyme Microb. Technol.*, **18**, 536-539.

²⁸¹ Kawamoto, T. y Tanaka, A. (1995) *Appl. Microbial Technol. Biotechnol.*, **43**, 639-643.

Figura IV.61. Reacción de esterificación de terpenos catalizada por UAB. Condiciones de reacción: terpeno 0,1 M; acetato de vinilo 0,1 M; 30 °C, 500 rpm, volumen final 10 ml de hexano.



Pero en este caso los tres alcoholes primarios conducen a la misma conversión, cosa que no ocurría con la lipasa de Sigma.

Otra diferencia notable es que las conversiones obtenidas con los alcoholes secundarios (mentol e isomentol) son mayores con la lipasa UAB que con la de Sigma.

Así mismo, vemos que pasadas las 48 h la conversión se mantiene constante en todos los casos, lo cual se debe atribuir a una desactivación del biocatalizador.

Así pues otra vez la diferente proporción de isoformas produce diferente actividad y especificidad en el acto catalítico. Otra vez vemos que la LIP 2 (Tabla IV.6) parece ser más activa que LIP 3 y LIP 1 para este proceso de transesterificación de alcoholes.

La lipasa UAB parece ser más sensible al impedimento estérico relacionado con la cadena del alcohol que la LCRC, pues ahora nerol y geraniol presentan la misma actividad relativa y estos dos son esterificados más rápidamente que el farnesol.

No obstante, dado que ambas lipasas se diferencian en tipo de isoforma y contenido relativo, es difícil asignar especificidades a cada enzima. Esto queda pendiente de un futuro

desarrollo con ambas enzimas puras.

Tabla IV.35. Resultados de la transesterificación de terpenos catalizada por LCRM y UABM expresados en mmol ester obtenido/mg de preparado ($t_r = 115h$).

Preparado	Mentol	Isomentol	Neomentol	Nerol	Geraniol	Farnesol
LCRM	$1,45 \cdot 10^{-4}$	-	-	$6,68 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$
UABM	$2 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-4}$	-	$5,3 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-3}$	$4,2 \cdot 10^{-3}$

Seguidamente se emplearon las lipasas modificadas covalentemente con dextranos como biocatalizadores en estos procesos (Tabla IV.35).

Como ocurría en el caso de las lipasas crudas la UABM es más activa que la LCRM lo cual debemos atribuirlo a su diferente composición (Tabla IV.6).

Por lo que se refiere a especificidad y actividad catalítica, hay que decir que ésta es semejante a la que da las preparaciones sin modificar. De ello cabe deducir que la modificación realizada con dextranos no afecta al centro activo ni a la tapadera de la enzima.

4. MODELIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENZIMA-SUSTRATO.

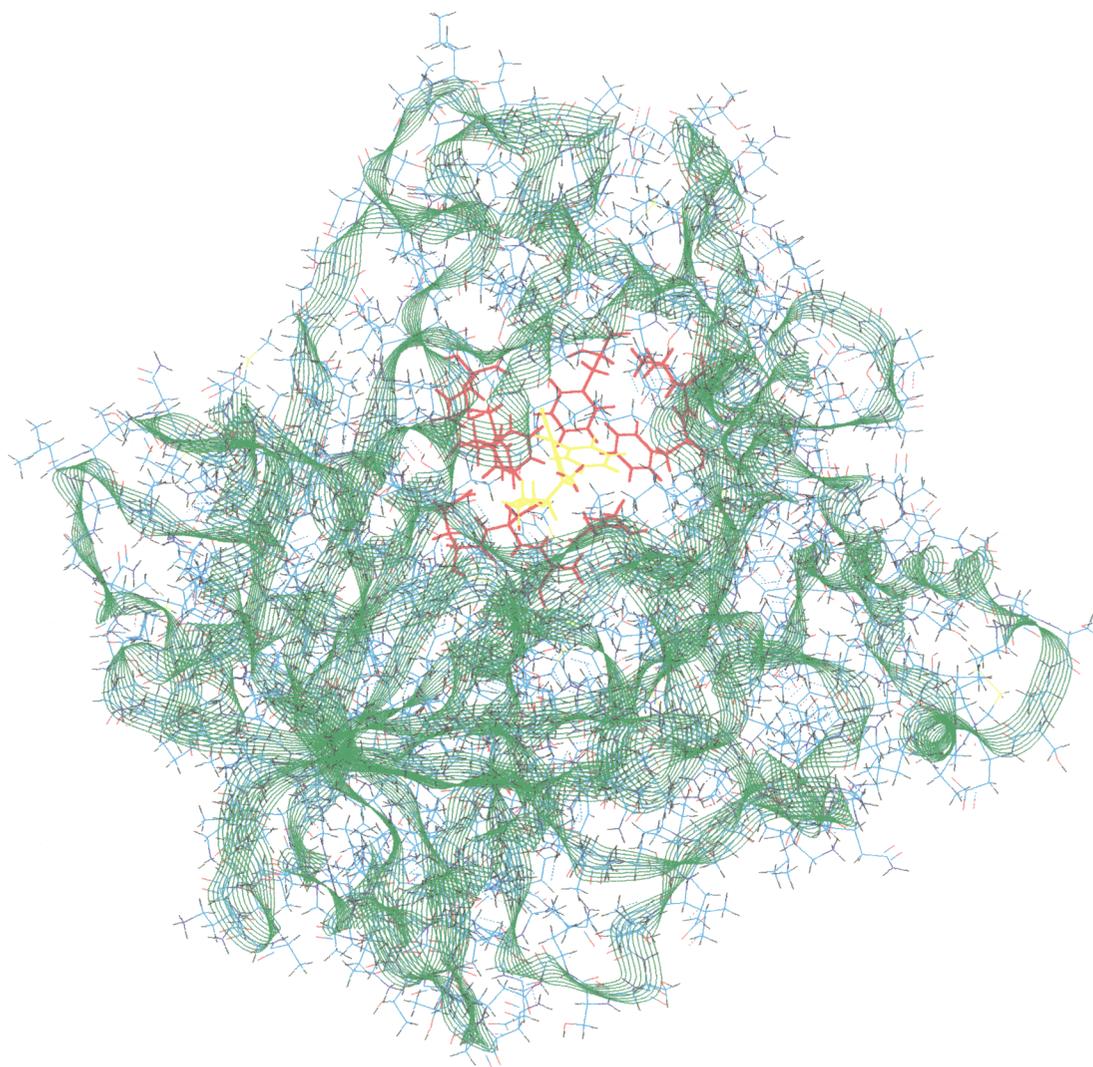
4.1. Elección de la zona de interacción con el sustrato.

Anclaje del sustrato con el centro activo.

Para realizar el anclaje de una molécula sobre otra se pueden utilizar diferentes metodologías. Mediante un programa especialmente diseñado se procede al acercamiento de una molécula sobre otra eligiendo como variables, posiciones, distancias y ángulo de ataque y realizando el análisis en función de la minimización de la energía total del sistema. Este sistema resulta conveniente cuando se desea realizar una búsqueda sistemática de las probables regiones de interacción intermolecular. Obviamente el requerimiento previo del proceso de minimización es la definición del sitio aproximado de anclaje. Como es sabido en el acto catalítico, los residuos implicados en el caso de la lipasa de *Candida rugosa*, son la triada catalítica: Ser, Hys y Glu. Basándonos en esto, se realizó la aproximación simulando el proceso en función del estado tetraédrico denominado Td₁ y haciendo la modificación correspondiente a la Ser-209 y al sustrato considerado, (*R*) o (*S*) ketoprofeno, para establecer la unión correspondiente con el módulo *build* del programa Hyperchem 5.1 Pro.

Las estructuras obtenidas en ambos casos se consideraron como las estructuras de partida y se denominaron KS5p para el complejo (*S*) ketoprofeno-LCR y KR5p para el complejo (*R*) ketoprofeno-LCR. En estas estructuras se llevó a cabo una optimización de la geometría del sistema con el algoritmo Fletcher-Reeves hasta un valor de convergencia de 0,01, hasta que las distancias y ángulos de enlace entre átomos se encontrasen a valores estándar.

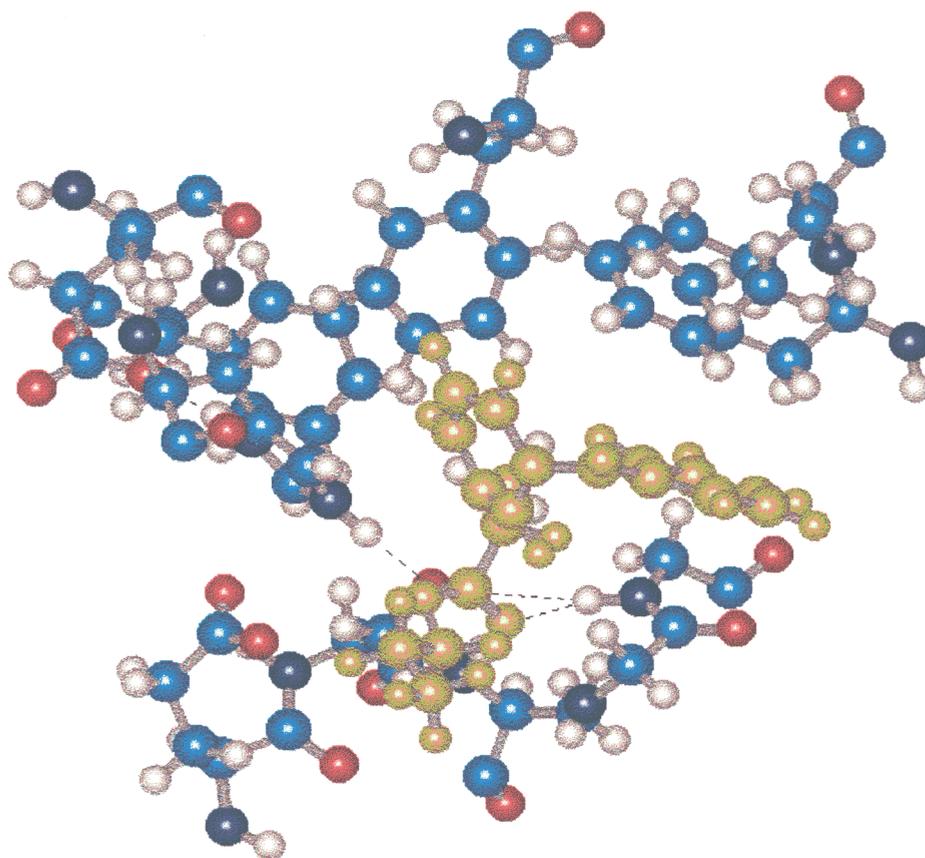
Figura IV.62. Estructura tridimensional de la lipasa de *Candida rugosa* (LIP1). Los residuos de color rojo corresponden al centro activo.



Elección de la zona de interacción con el sustrato (R) o(S) ketoprofeno.

Como se indicó en la *Parte Experimental*, la elección de la zona a estudiar es de gran importancia debido a que el tamaño del sistema es excesivamente grande. Puesto que el sistema se encuentra constituido por 7500 átomos aproximadamente, es inviable un estudio que tenga en cuenta todos los átomos del sistema con las herramientas de cálculo que disponemos. Es por ello por lo que se eligió un conjunto de residuos significativos.

Figura IV.63. Complejo (S) ketoprofeno-LCR inicial, con el conjunto de aminoácidos seleccionados.



Puede observarse que inicialmente el sustrato se dispone de tal forma que uno de los anillos se oriente hacia la Phe-345 y el otro hacia la Phe-296. Los puentes de hidrógeno que se forman no corresponden exactamente a la especificación del centro activo teórico puesto que como puede observarse la Gly-124 forman dos puentes de hidrógeno. Uno de ellos sería hacia el O⁻ del sustrato y el otro hacia el O-R del sustrato, hecho no descrito hasta el momento. Los datos correspondientes a la energía de Van der Waals, ángulos de enlace, etc., se encuentran en la Tabla IV.36. Estos datos iniciales nos servirán para comparar respecto al estado inicial después de obtener los conformeros por dinámica molecular.

Tabla IV.36. Datos correspondientes al complejo de interacción (*S*)-ketoprofeno y la LCR.

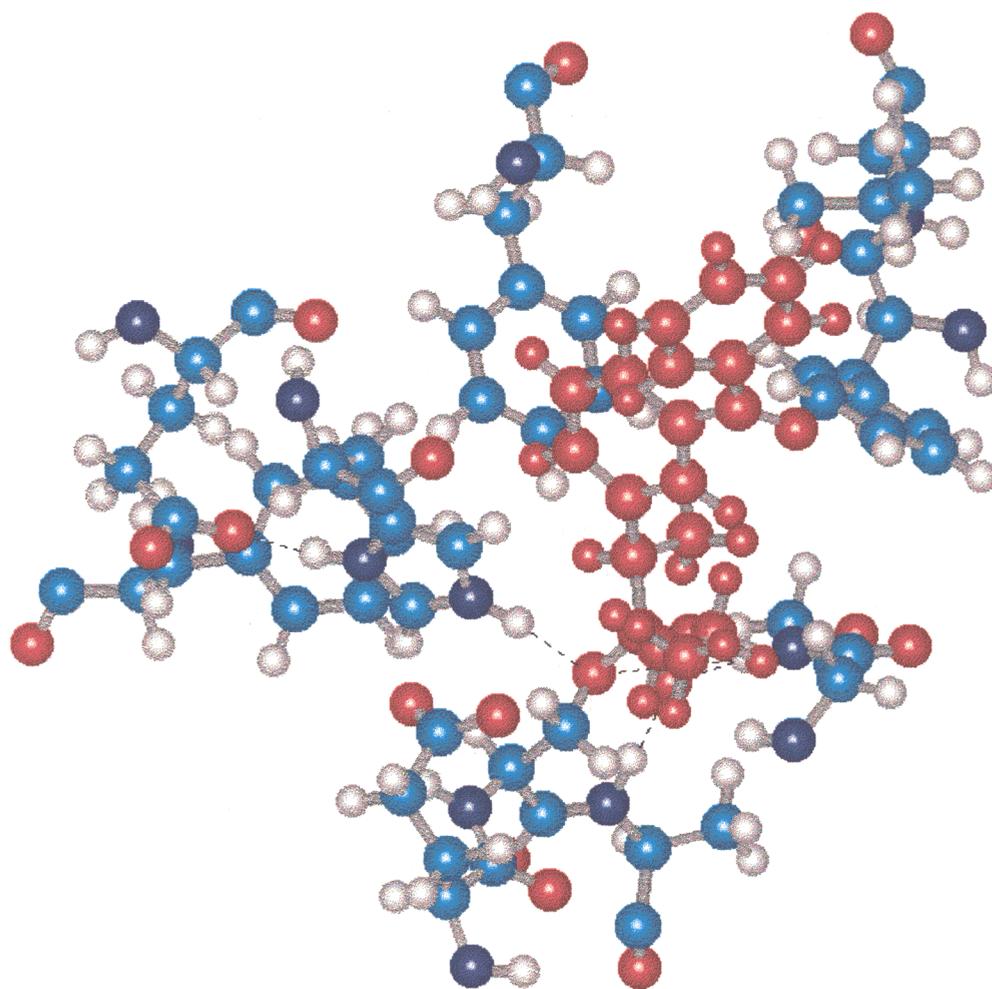
Confórmero	V _{Ángulo}	V _r (Kcal/mol)	V _{diedro (φ)}	V _{VdW}	V _{enlace H}	V _{electrostát.}	V _{enlace}	Nº Enlaces H
1DKS5P	36,5	-353	44,9	-101,9	-3,83	-330,9	3,52	1
S3A1	36,4	-368	36,4	-101,4	-6,08	-338,4	4,13	-
S3A2	35,96	-375	35,3	-110,5	-6,62	-333,3	3,98	2
S3A3	35,98	-373	35,78	-110,3	-6,58	-332,6	3,8	2
S3B1	36,9	-362	43,28	-107,0	-6,28	-333,4	4,53	2
S3B2	34,4	-369	38,2	-106,5	-6,23	-332,6	3,5	1
S3B3	35,1	-375,7	34,9	-111,7	-6,59	-331,2	3,77	2
S3C1	40,9	-349,4	44,48	-97,4	5,54	-335,9	4,03	-
S3C2	35,7	-372	36,69	-109,78	-6,04	-332,4	3,3	-
S3C3	35,6	-370	33,96	-105,7	-6,36	-332,0	3,9	2
S31A1	36,3	-371	35,3	-107,79	-6,66	-332	4,03	2
S31A2	35,5	-374,6	31,8	-107,2	-6,46	-332	4,0	2
S31A3	36,2	-368,9	37,3	-107,3	-6,06	-333	4,33	2
S31B1	35,5	-369,5	34,7	-105,8	-5,77	-332	4,12	2
S31B2	37,3	-373,5	32,38	-107,7	-5,82	-333	3,49	1
S31B3	36,0	-376,3	34,16	-111,07	-6,4	-332	3,84	2
S31C1	35,6	-376,7	32,8	-109,12	-5,76	-333,7	3,5	2
S31C2	35,6	-371,29	34,14	-107,5	-6,16	-331,2	3,9	2
S31C3	36,61	-370,66	33,39	-107,82	-5,53	-331,99	3,67	1

La estrategia seguida para la interacción de *R*-ketoprofeno con la enzima fue análoga a la indicada anteriormente para la interacción del *S*-ketoprofeno y la lipasa.

Puede observarse cómo inicialmente se disponen el sustrato con el mismo número de puentes de hidrógeno que para el caso del (*S*) ketoprofeno-LCR, si bien como es lógico la disposición espacial del confórmero en el centro activo es diferente. El primer anillo se dispone hacia la Phe-345, si bien el segundo anillo se queda orientado hacia el exterior del centro activo.

Otro aspecto importante a tener en cuenta, es el hecho de que en el cálculo de dinámica molecular, sólo se han considerado 200 moléculas de agua, que son las correspondientes al agua de cristalización de la proteína. La elección de este sistema se encuentra justificada por el hecho de que existen evidencias experimentales que indican cambios en la enantioselectividad de la enzima al trabajar en condiciones de hidratación y anhidras en reacciones de esterificación en medios orgánicos.

Figura IV.64. Complejo (*R*) ketoprofeno-LCR inicial con el conjunto aminoácidos.



Estudio conformacional del complejo S-ketoprofeno-LCR

Para llevar a cabo el análisis detallado del espacio conformacional del complejo, se procedió a realizar un cálculo de dinámica molecular que *a priori* podría permitir comprobar variaciones estructurales del complejo formado inicialmente. Las condiciones en las que se llevó a cabo la dinámica se encuentra detallada en la *Parte experimental*.

En el Esquema IV.4 se encuentra recogido un resumen del proceso con los conformeros finales obtenidos. Es necesario precisar que después de cada proceso de dinámica molecular se sometían a los conformeros a una optimización de la geometría al objeto de evitar en lo posible contactos de Van der Waals indeseables.

Esquema IV.4. Colección de conformeros obtenidos para el complejo S-ketoprofeno y LCR.

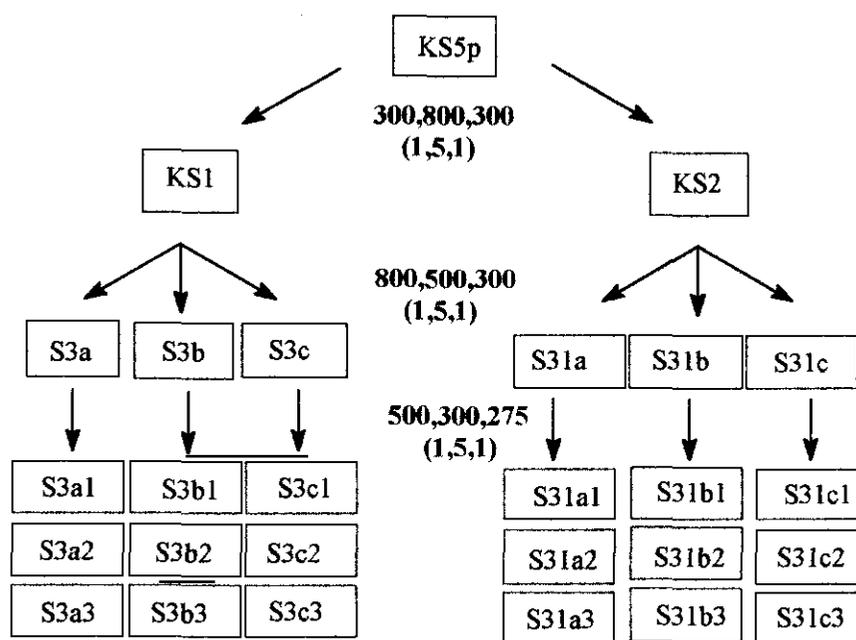
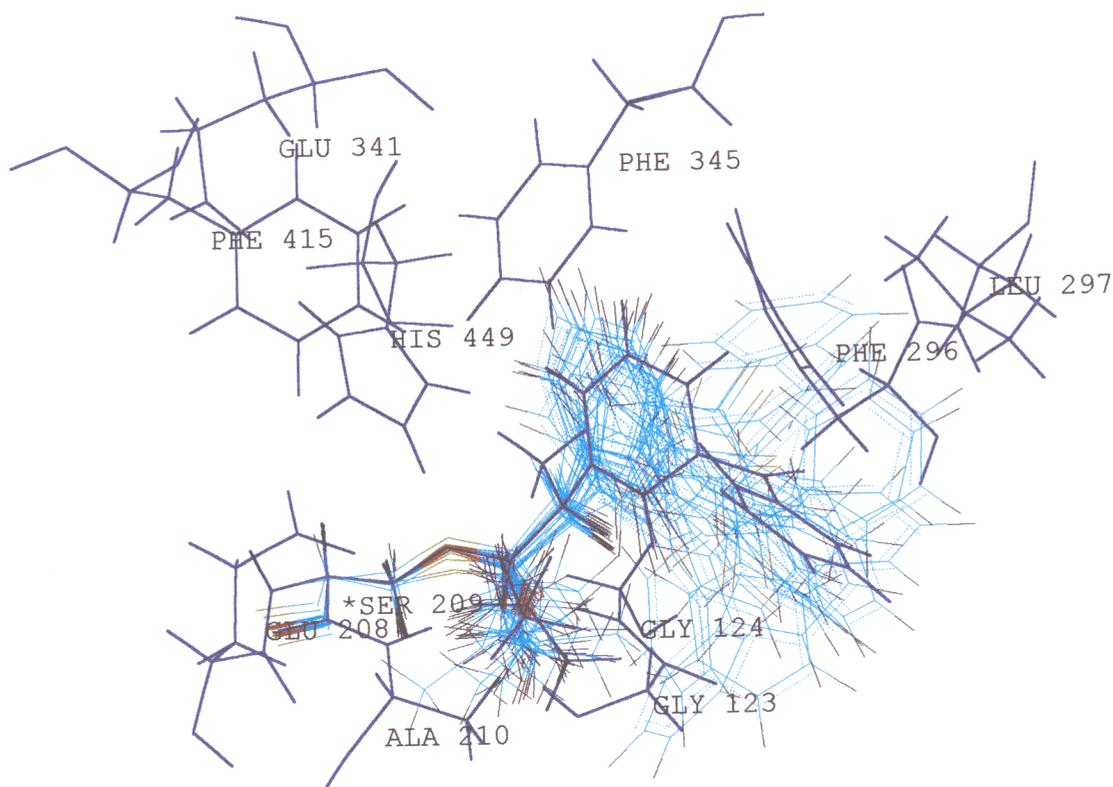


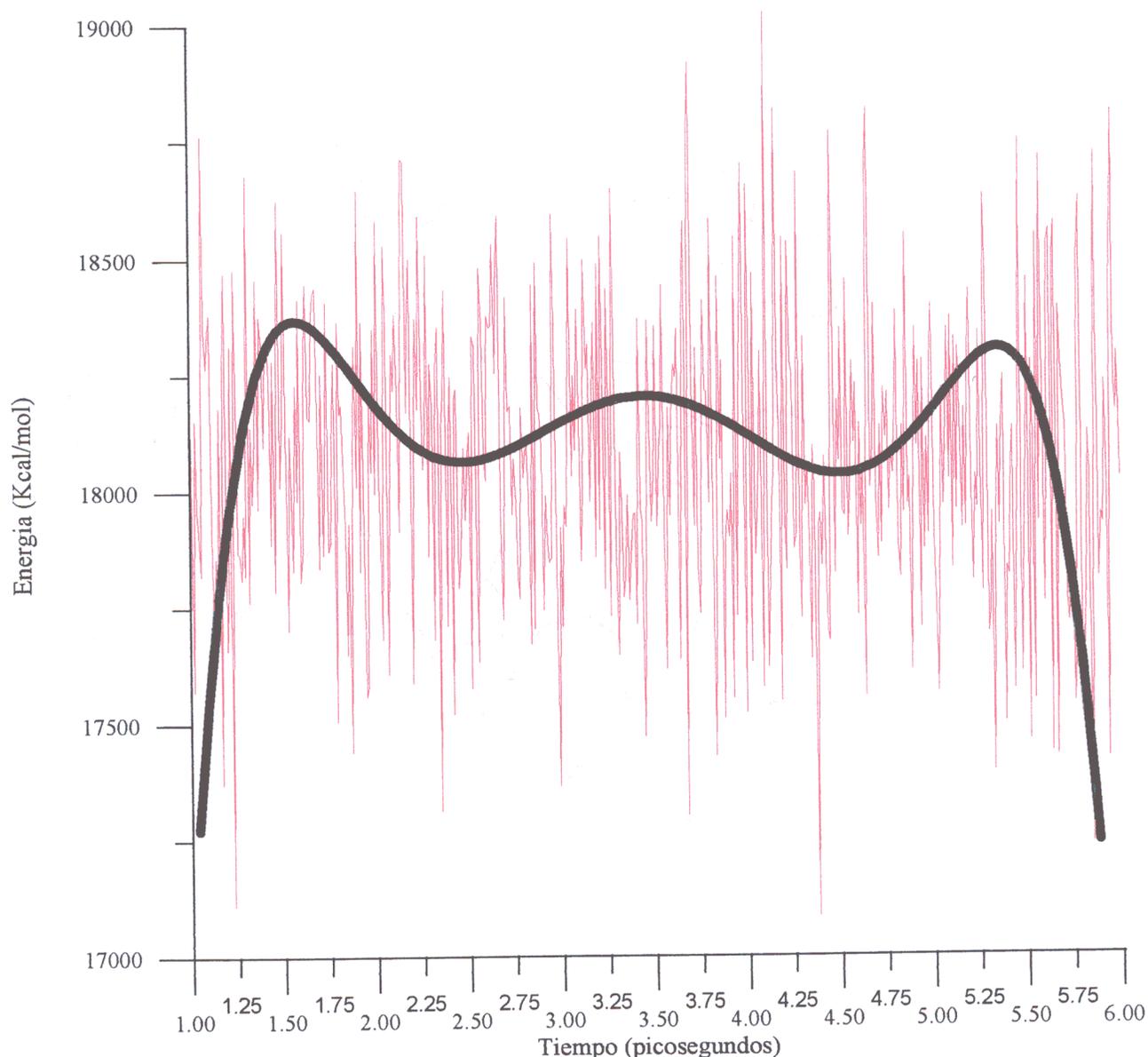
Figura IV.65. Superposición de conforméros finales obtenidos en el proceso de dinámica molecular para el complejo (S) ketoprofeno-LCR.



Puede observarse que la disposición de todas las estructuras de los conforméros presenta poca movilidad en el primer anillo, orientándose ésta preferentemente hacia la Phe-345, mientras que aumenta la libertad conformacional en el segundo anillo.

La obtención de los mínimos correspondientes en cada fase del proceso se lleva a cabo mediante el ajuste de los datos correspondientes a la gráfica energía total del sistema frente al tiempo en picosegundos obtenida de la dinámica a una función polinómica de grado 10 (Figura IV.65). Los mínimos obtenidos son los conforméros representativo de la s diferentes poblaciones de mínima energía.

Figura IV. 66. Colección de conformeros obtenidos en la dinámica del complejo inicial KS5p a 800 °C.



En la fase final de enfriamiento se obtiene una colección de conformeros que después de minimizada su estructura podemos disponer de los distintos componentes de la energía del sistema según la ecuación [7] (Tabla IV.36).

Si comparamos los valores de energía entre el conformero inicial y los obtenidos al final del proceso podemos observar que en todos los casos que la energía es menor en los conformeros finales respecto al inicial. Este hecho puede justificarse en base a que la energía del conformero

inicial puede corresponder a un mínimo local en relación a los conformeros finales, y a que estos corresponderían a poblaciones de conformeros de mínima energía. Otro criterio que podría ser tenido en cuenta para fijar el complejo tetraédrico sería el análisis de la formación de puentes de hidrógeno obtenidos en los diferentes conformeros en el estado de transición. Podemos indicar el hecho no descrito hasta el momento de la formación de dos puentes de hidrógeno entre la Gly-124 y el O-C* y la Gly-124 y RO-C*.

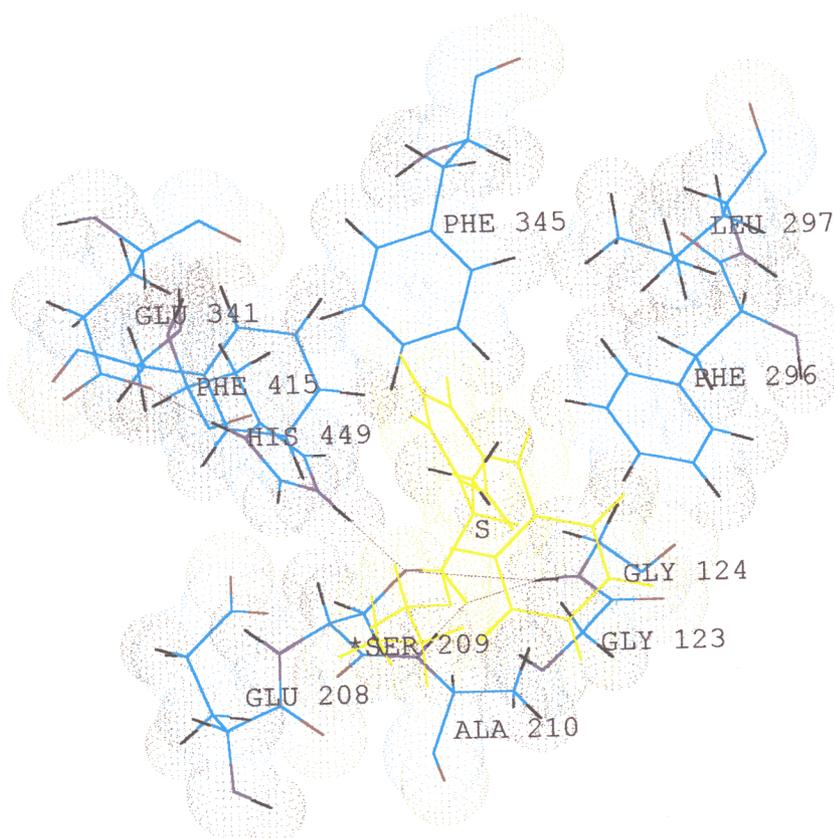
Tabla IV.37. Ángulos de enlace correspondientes al complejo tetraédrico formado entre *S*-ketoprofeno y LCR.

Conformero	C*-C _{Ser}	C*-OR	C*-O
SK5p	111,074	107,221	109,367
S3a1	113,371	106,938	109,669
S3a2	112,038	110,785	108,879
S3a3	114,448	108,763	109,46
S3b1	115,903	111,99	109,347
S3b2	112,313	112,559	110,205
S3b3	110,791	107,597	111,785
S3c1	111,896	109,503	110,738
S3c2	114,316	110,276	112,184
S3c3	114,13	108,119	109,31
S31a1	112,928	109,844	109,218
S31a2	112,24	108,089	109,801
S31a3	113,246	110,149	109,469
S31b1	113,305	110,172	110,086
S31b2	112,544	112,413	109,882
S31b3	113,44	109,343	109,22
S31c1	111,248	107,452	109,024
S31c2	111,233	108,183	109,679
S31c3	110,326	108,291	109,883

Finalmente indicar que puesto que se pretende simular el estado de transición denominado Td_1 , las desviaciones de los ángulos de enlace con respecto al estado tetraédrico teórico ($109,5^\circ$) serían una medida de la deformación del sistema y por tanto de la idealidad del mismo. En la Tabla IV.37 aparecen representados los valores de los ángulos de enlace correspondiente a C^*-O^- , C^*-OR y $C^*-C-Ser-209$. Puede observarse que la desviación del estado tetraédrico teórico se produce en mayor medida en el enlace $C^*-C-Ser 209$.

El criterio de elección de conformeros más representativos del sistema debería hacerse por tanto en base a los valores de energía total, enlaces de hidrógeno formados y desviación del ángulo tetraédrico de $109,5^\circ$ en el carbono central del estado de transición. En el caso del (*S*) ketoprofeno-LCR los valores menores de energía corresponden a los conformeros S31b3 y S31c1. Debido a que los conformeros que presentan un enlace de hidrógeno entre la Gly-124 y el C^*-O^- , tienen pequeños valores de energía y responden al estado de transición teórico descrito en la bibliografía, no deberían descartarse sin un análisis más detallado. Elegimos el conformero S31b2 que presenta el menor valor de energía entre todos los conformeros que tienen un puente de hidrógeno. Rechazamos el conformero S31b2 porque el estado de transición se aleja más del *tetraedro* que los conformeros S31b3 y S31c1, y entre estos el que más se acerca a la idealidad sería S31b3, a pesar de ser ligeramente superior en energía aunque la diferencia es despreciable.

Figura IV.67. Estado de transición representativo del complejo (S) ketoprofeno-LCR (S31b3)



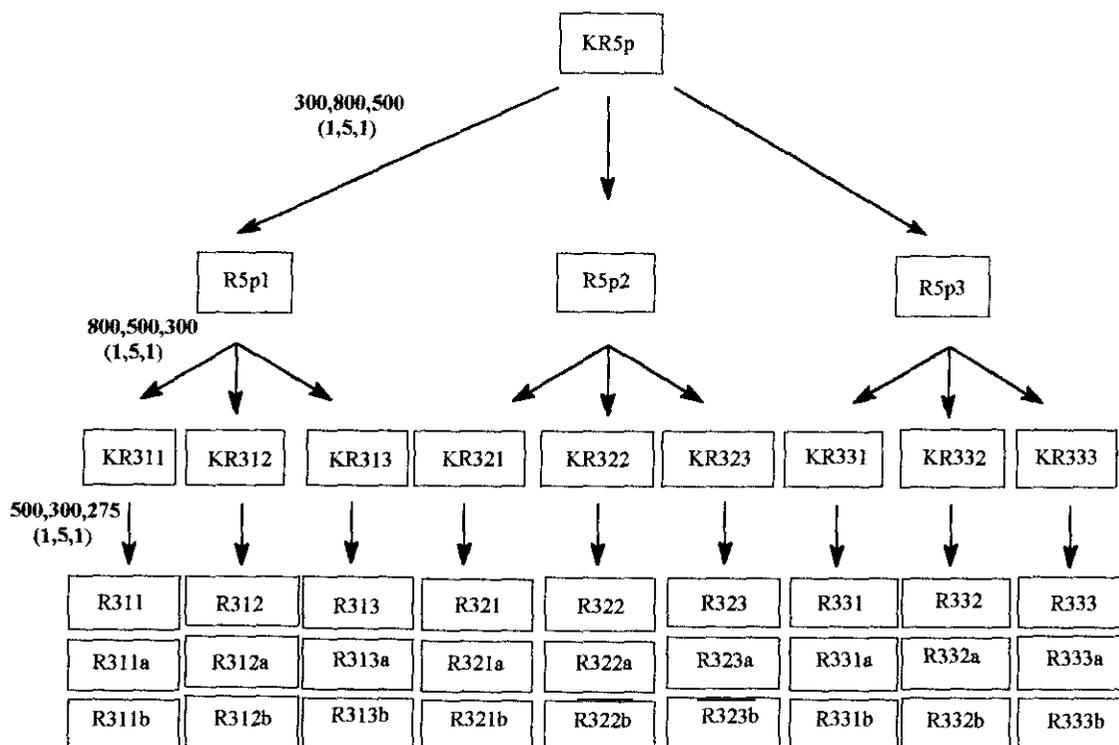
En dicha figura podemos observar la formación de puentes de hidrógeno teóricos así como las nubes de carga correspondientes a cada estructura, observándose que no existe interacción entre las nubes de Van der Waals del sustrato y los residuos del centro activo.

Estudio conformacional del complejo R-ketoprofeno-LCR.

El procedimiento seguido para el análisis del espacio conformacional del complejo (R) ketoprofeno-LCR es similar al que se ha detallado en el apartado anterior. Así como el protocolo de cálculo de dinámica molecular seguido. El resumen de pasos seguidos para realizar la dinámica molecular se presenta en el esquema donde aparece recogida la nomenclatura de la colección de conformeros obtenidos en el proceso de dinámica molecular. Al igual que ocurría

anterior la energía correspondiente al conformero inicial es mayor que la correspondiente a los conformeros finales obtenidos, excepto en el conformero S3c1 lo cual es debido a que en este caso se aparta totalmente del estado de transición teórico.

Esquema IV.5. Colección de conformeros obtenidos a partir del complejo *R*-ketoprofeno y LCR.



En la Figura IV.68 se representa la superposición de conformeros obtenidos por dinámica molecular donde puede comprobarse que la disposición de los anillos es diferente respecto al *S*-ketoprofeno y los anillos se disponen hacia fuera del centro. Los valores de energía del proceso obtenidos por optimización de la geometría posterior al proceso de dinámica molecular se encuentran representados en la Tabla IV.38. y los ángulos correspondientes a los diedros representativos del estado tetraédrico en la Tabla IV.39.

Figura IV.68. Superposición de conformeros de (R) ketoprofeno con LCR.

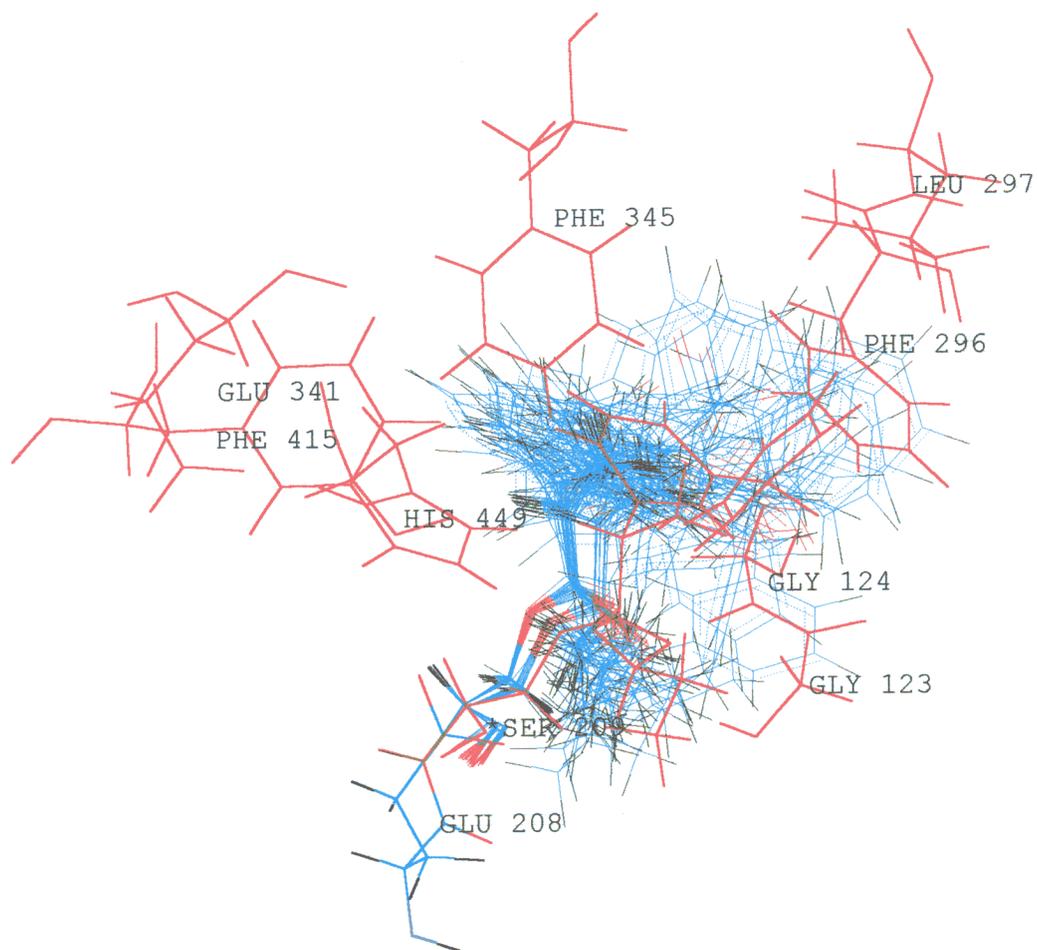


Tabla IV.38. Datos correspondientes al complejo (*R*) ketoprofeno-LCR inicial.

Confórmero	V _{Ángulo}	V _r (Kcal/mol)	V _{diedro} (φ)	V _{VdW}	V _{enlace H}	V _{electrostát.}	V _{enlace}	N ^o Enlaces H
LKR5p	35,39	-374,62	33,71	-115,7	-6,28	-325,47	3,71	-
R311	37,26	-371	33,46	-110,26	-6,06	-330,4	4,46	2
R311a	36,19	-373	30,89	-110,93	-6,55	-327,64	4,07	2
R311b	36,15	-373,9	27,81	-111,36	-6,12	-324,25	3,85	2
R312	38,4	-355,2	44,66	-108,22	-5,99	-328,4	4,36	2
R312a	35,15	-361,54	46,92	-104,03	-5,11	-338,44	3,91	2
R312b	38,15	-368,7	37,16	-111,79	-6,4	-330,79	4,76	2
R313	37,13	-368,3	34,12	-108,21	-6,38	-329,35	4,38	2
R313a	35,7	-370,9	35,86	-114,09	-6,61	-325,37	3,57	2
R313b	36,73	-371,5	33,24	-110,45	-6,77	-328,67	4,41	2
R321	36,71	-357,2	45,49	-106,8	-6,5	-330,45	4,33	2
R321a	39,14	-361,8	33,95	-99,47	-6,8	-333,26	4,63	2
R321b	38,03	-363,3	36,74	-105,18	-6,6	-330,98	4,63	2
R322	40,19	-344	50,49	-104,41	-5,69	-328,8	4,04	2
R322a	38,7	-357,2	39,8	-106,2	-6,46	-327,43	4,36	2
R322b	35,8	-369,1	37,79	-109,74	-6,46	-330,18	3,69	2
R323	38,07	-356,64	36	-114,5	-6	-314,46	4,25	2
R323a	37,48	-363,04	32,7	-114,16	-5,92	-317,34	4,19	2
R323b	36,41	-366,57	33,06	-115,25	-5,88	-318	3,89	1
R331	39,27	-363,24	34,88	-108,62	-6,28	-327	4,51	1
R331a	40,25	-362,7	34,27	-106,14	-6,31	-329,32	4,45	1
R331b	38,8	-365,15	30,47	-115,88	-5,96	-316,87	4,29	1
R332	39,47	-363,7	40,62	-110,49	-6,35	-331,06	4,06	2
R332a	35,99	-366,2	43	-112,91	-6,62	-329,78	4,1	2
R332b	37,6	-367,1	39,86	-114,59	-7,05	-326,59	3,63	2
R333	37,91	-354,4	40,38	-118,04	-5,75	-312,71	3,77	1
R333a	37,85	-363,9	35,27	-108,77	-6,47	-326,26	4,48	2
R333b	39,43	-357,16	37,96	-107,19	-6,58	-325,4	4,62	1

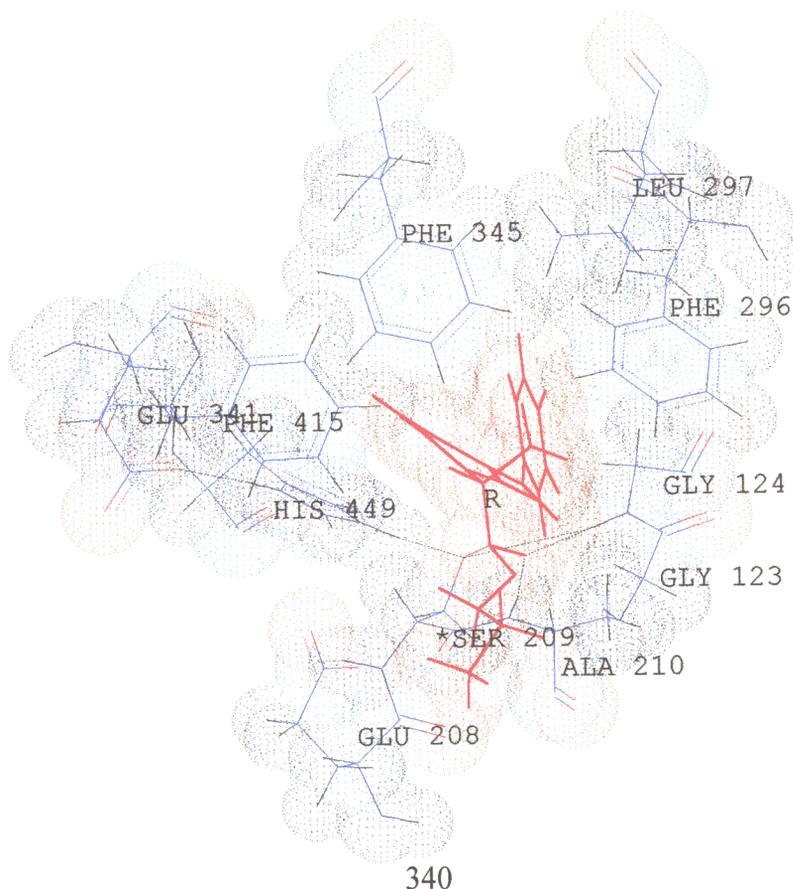
Tabla. IV.39. Datos correspondientes al complejo tetraédrico formado entre *R*-ketoprofeno y LCR.

Confórmero	C*-C _{Ser}	C*-OR	C*-O ⁻
RK5p	108,675	110,64	115,26
R311	109,81	110,715	117,08
R311a	109,41	110,541	115,874
R311b	110,753	111,272	114,724
R312	110,99	113,435	116,694
R312a	107,483	96,726	114,512
R312b	110,917	108,329	116,369
R313	110,563	111,503	116,852
R313a	108,863	109,756	115,451
R313b	109,753	112,878	116,01
R321	110,505	112,701	116,039
R321a	111,551	114,279	115,335
R321b	110,51	108,612	116,315
R322	111,022	115,272	115,08
R322a	109,604	114,415	114,507
R322b	109,204	111,495	116,106
R323	110,069	112,03	115,713
R323a	110,331	111,505	116,189
R323b	108,982	110,745	116,491
R331	109,649	114,744	115,005
R331a	109,352	115,019	114,878
R331b	109,059	114,476	114,835
R332	109,265	116,327	115,12
R332a	109,567	111,733	115,92
R332b	107,976	111,418	115,739
R333	109,257	114,122	114,2
R333a	110,254	109,194	116,626
R333b	109,814	110,243	115,123

Si comparamos la energía inicial correspondiente al complejo (*R*) ketoprofeno-LCR, denominado KR5p, es menor que en el caso de complejo *S*, denominado KS5p. Este hecho, puede justificarse en base a que el anclaje del sustrato en el centro activo se realiza de forma manual y por tanto, los valores de energía correspondientes a los mínimos obtenidos pueden ser locales.

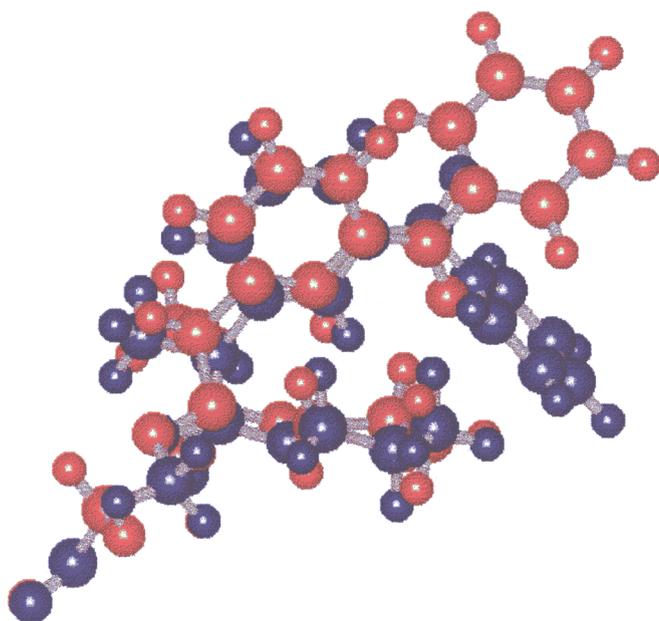
El análisis conjunto de ambas tablas, nos mostró que el conformero R311b es el que presenta una menor deformación respecto a los valores de distancias y ángulos en el estado de transición, como se puede comprobar por los valores de los ángulos y también por el hecho de que es el conformero que presenta menor energía. En la Figura IV.69 aparece representado el estado de transición R311b en el que se visualiza la nubes de Van der Waals y los puentes de hidrógeno correspondientes. En este caso, el primer anillo se encuentra orientado hacia la Phe-296 y el segundo se encuentra desplazado del centro activo.

Figura IV.69. Interacción del conformero R311b con LCR.



En la Figura IV.70 se puede observar la superposición de los conformeros S y R finales que presentan una menor energía y una mejor adaptación al estado tetraédrico, comprobándose que el primer anillo prácticamente no se mueve, siendo el segundo anillo el que define la interacción con la Phe-296.

Figura IV.70. Superposición de los conformeros finales seleccionados, en azul se representa el conformero correspondiente a Ser-209-(*S*)-ketoprofeno y en color rojo el perteneciente a Ser-209-(*R*)-ketoprofeno.



De todo lo dicho anteriormente puede concluirse que tanto con *R* como con *S* ketoprofeno, podemos encontrar conformeros que cumplen las especificaciones del estado de transición teórico. Esto nos indica que ambos isómeros son susceptibles de ser sustratos de la enzima como se ha demostrado en esta Memoria, si bien debe haber una mayor preferencia respecto al isómero *S* que al *R* tal y como se ha visto en la presente Tesis Doctoral.

V. CONCLUSIONES

1. Empleando lipasas crudas de la levadura de *Candida rugosa* obtenidas en diferentes condiciones de fermentación (UAB, UAB-100 y UAB-300) y en distinto grado de purificación (LCRS, LCRA y LCRB) se ha comprobado que el control de las condiciones de fermentación nos permite obtener derivados con diferente proporción y contenido de isoformas, lo cual produce una diferente actividad catalítica en reacciones de hidrólisis y de síntesis.
2. Se ha estudiado el grado de hidratación de los preparados enzimáticos y se han contrastado los resultados empleando para ello diferentes técnicas analíticas (RMN de H₂O, ATG/ATD y análisis de las isothermas de sorción de agua). Se ha comprobado que los procesos de semipurificación y purificación enzimática afectan al microentorno de la enzima y a su estado de hidratación. Así mismo el control de las condiciones de fermentación proporciona biocatalizadores (UAB) con diferente grado de hidratación que la enzima comercial.
3. Mediante las técnicas empleadas se ha comprobado que la isoforma A de la lipasa de *Candida rugosa* (LCRA) es más hidrófila que la isoforma B (LCRB), llegándose a cuantificar el número de moléculas de agua que rodea a las isoformas.
4. Se han modificado las preparaciones semipurificadas (LCRS Y UABS) con dextranos a través de unión covalente y no covalente desarrollando un método nuevo de cuantificación de la modificación. Se ha provocado un cambio en el balance hidrofilia/hidrofobicidad de la superficie del biocatalizador, debido a la naturaleza polimérica del dextrano, que proporciona un gran número de grupos OH que ligan moléculas de agua alrededor de la enzima, modificando y estabilizando la estructura

- proteica. En todos los casos se ha comprobado un aumento de la estabilidad de los derivados modificados (covalente y no covalentemente), comparando los resultados con la preparación comercial suministrada por Sigma o la UAB cruda sin modificar.
5. En la esterificación de ácidos (*R,S*) 2-aril propanoicos, se ha realizado un control de las variables que afectan a la reacción, los resultados indican que la actividad catalítica depende de la lipofilia del sustrato, la hidrofobicidad del disolvente y el estado de hidratación del biocatalizador, representado por su a_w . Dada la importancia que tiene la presencia de agua en las reacciones catalizadas enzimáticamente en medio orgánico, se procedió al análisis de la influencia que tiene la sustitución del agua por la adición de alcoholes que se comportan como miméticos del agua, dada su capacidad de formar puentes de hidrógeno con los grupos polares de la proteína, obteniendo excelentes resultados en la aplicación de reacciones en medio orgánico.
 6. En la transesterificación de alcoholes terpénicos se comprueba que la reactividad de la lipasa UAB (en estado nativo y modificada covalentemente) es la misma que presenta la LCRC (nativa y modificada covalentemente). La actividad catalítica es mayor en UAB (nativa y modificada) debido a su diferente contenido y proporción de isoformas.
 7. A través de la modelización molecular se ha comprobado que los conformeros finales (*R*) y (*S*) ketoprofeno de menor energía presentan una mejor adaptación al estado tetraédrico. Por ello, ambos isómeros son susceptibles de ser sustratos de la lipasa de *Candida rugosa*, aunque existe una marcada preferencia hacia el isómero *S*.