

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



**Casa abierta al tiempo**

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Construcción de CLEAs de lipasas: evaluación  
del efecto y modulación de la  
enantioselectividad

**TESIS**

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA**

Presenta:

M. en B. Susana Velasco Lozano

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesores: Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Dr. Juan Carlos Mateos Díaz

México, D.F. Agosto 2014

---

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, con la referencia “**001466**”. Este trabajo contó con el apoyo del CONACyT a través de la beca No. 307021. Así mismo, esta institución otorgó una beca mixta durante la estancia de un año en el Instituto de Catálisis y Petroleoquímica de la Universidad Autónoma de Madrid, España (No. Proyecto 154004).

---

Iztapalapa, D.F., Agosto de 2014.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

“Construcción de CLEAs de lipasas: evaluación del efecto y  
modulación de la enantioselectividad”

Que presentó:

**M. en B. Susana Velasco Lozano**

Comité tutorial:

Director: Dr. Ernesto Favela Torres  
Asesores: Dr. Rafael Vázquez Duhalt  
Dr. Juan Carlos Mateos Díaz

Jurado:

Presidente: Dr. Rafael Vázquez Duhalt  
Centro de Nanociencias y Nanotecnología UNAM

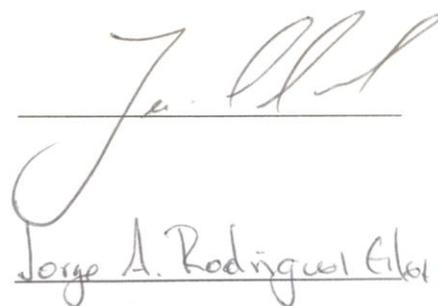
Secretaria: Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero  
Biotecnología UAM-I

Vocal: Dr. Juan Carlos Mateos Díaz  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología  
y Diseño del Estado de Jalisco A.C.

Vocal: Dr. Jorge Alberto Rodríguez González  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología  
y Diseño del Estado de Jalisco A.C.



Handwritten signature of Dr. Rafael Vázquez Duhalt, President of the Jury, over a horizontal line.



Handwritten signature of Dr. Jorge Alberto Rodríguez González, Vocal, over a horizontal line.

---

## AGRADECIMIENTOS

Principalmente quiero agradecer a mi amigo y director de tesis, Ernesto. Quien me brindó un espacio para crecer en su hogar de trabajo, la PP4. Después de este tiempo de conocerlo, me es muy grato recordar todos aquellos momentos en los que juntos aprendimos, nos estresamos, nos alegramos y hasta en los que discutimos. Quiero agradecerle por su confianza en mí, por el gran apoyo que me dio y por ser ese consejero, amigo y jefe especial con el que deseo seguir compartiendo muchos momentos más.

También quiero agradecer infinitamente al Dr. José Manuel Guisán y a todo su excelente grupo de trabajo, por recibirme en España y compartir sus métodos de trabajo, sus maneras de pensamiento y su valiosa amistad. Particularmente, quiero agradecer a los doctores Fernando López y Javier Rocha quienes directamente me enseñaron y dirigieron durante mi estancia allá. Por sus valiosos comentarios y su apoyo constante, muchas gracias.

Agradezco a mis dos asesores, el Dr. Rafael y el Dr. Juan Carlos, quienes con sus asesorías, comentarios y revisiones nos apoyaron durante el proceso de realización y mejora del presente trabajo.

Agradezco a los miembros del jurado cuyos comentarios sirvieron para la mejora y enriquecimiento del presente documento.

Finalmente quiero darle las gracias a mis compañeros de la PP4 por la ayuda que me brindaron, el maravilloso ambiente de trabajo que tenemos y por aquellos momentos en los que compartieron conmigo mis alegrías, angustias, cansancio y éxitos.

---

## DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a todas aquellas personas especiales que han estado a mi lado y que sin importar lo que pase siempre han creído en mí. Gracias a ellos he tenido fuerza y he encontrado la inspiración para hacer de este, nuestro mundo, un lugar más armonioso. Desde mi hermosa familia, mi querido papá, mi adorada hermana, mi querida mamá que aunque está lejos siempre encuentra la manera de hacerme saber que está conmigo. Mi querido e invencible abuelito, mi abuelita que desde el cielo nos acompaña, mis queridos y divertidos primos y tíos. Mis valiosas y contadas amistades, mis compañeros de trabajo. Pero sobre todo, dedico este trabajo a aquellos estudiantes que como yo, en algún momento de su formación requieran de una guía que les sirva de escalón para llegar más alto.

---

*“El mundo puede ser realmente un paraíso. De hecho, no existe otro paraíso a menos que construyamos uno aquí”*

Osho

---

## CONTENIDO

i.	RESUMEN .....	1
ii.	ABSTRACT .....	3
1.	INTRODUCCIÓN.....	5
2.	MARCO TEÓRICO .....	7
2.1.	Lipasas .....	8
2.1.1.	Estructura.....	10
2.1.2.	Fuentes de obtención .....	11
2.1.3.	Usos en la industria.....	12
2.1.4.	Mecanismo catalítico .....	13
2.1.5.	Sitio de unión del sustrato en lipasas .....	15
2.2.	Quiralidad .....	17
2.2.1.	Enantioselectividad.....	18
2.2.2.	Factores que modifican la enantioselectividad.....	21
2.2.2.1.	Tamaño de los sustituyentes: Regla de Kazlauskas .....	21
2.2.2.2.	Estructura del sustrato: Impedimentos estéricos .....	23
2.2.2.3.	Actividad termodinámica del agua.....	27
2.2.2.4.	Temperatura.....	28
2.2.2.5.	Aditivos presentes en el medio de reacción .....	29
2.2.2.6.	Concentración del sustrato .....	30
2.2.2.7.	Solventes .....	32
2.2.2.8.	Conformación tridimensional del sitio catalítico y de la estructura enzimática.....	32
2.3.	Inmovilización de enzimas .....	33
2.3.1.	Tipos de inmovilización .....	35
2.3.1.1.	Adsorción .....	35
2.3.1.2.	Atrapamiento .....	35
2.3.1.3.	Encapsulación.....	36
2.3.1.4.	Unión a soportes .....	36
2.3.1.5.	Autoinmovilización ó entrecruzamiento .....	37
2.3.2.	Inmovilización libre de soporte .....	37

---

2.3.3. Factores que modifican la actividad, estabilidad y selectividad de los agregados enzimáticos entrecruzados .....	42
2.3.3.1. Agentes precipitantes y condiciones de precipitación.....	42
2.3.3.2. Agentes y condiciones de entrecruzamiento .....	45
2.3.3.3. Estabilidad mecánica.....	46
2.3.4. Inmovilización de enzimas sobre soportes .....	47
2.3.4.1. Métodos irreversibles .....	47
2.3.4.1.1. Inmovilización de enzimas sobre soportes de agarosa activada con grupos bromuro de cianógeno .....	48
2.3.4.1.2. Inmovilización de enzimas sobre soportes de agarosa activada con grupos glioxil.....	48
2.3.4.1.3. Inmovilización de enzimas sobre soportes de agarosa activada con grupos monoamino-N-aminoetil y glutaraldehído .....	49
2.3.4.2. Métodos reversibles.....	50
2.3.4.2.1. Inmovilización de enzimas sobre soportes de agarosa activada con grupos monoamino-N-aminoetil .....	51
2.3.4.2.2. Inmovilización de enzimas sobre soportes de agarosa activada con grupos hidrofóbicos.....	51
2.4. Modificación química y física de enzimas .....	52
3. ANTECEDENTES .....	55
4. JUSTIFICACIÓN .....	61
5. OBJETIVOS.....	64
6. HIPÓTESIS .....	66
7. MATERIALES .....	68
7.1. Enzimas.....	69
7.2. Materiales.....	69
8. MÉTODOS .....	70
8.1. Métodos de determinación de la actividad lipasa por hidrólisis de ésteres de <i>p</i> -nitrofenol.....	71
8.2. Análisis de proteína .....	71
8.2.1. Cuantificación de proteína.....	71
8.2.2. Separación de proteínas por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	72

---

8.3. Estabilidad de la lipasa de <i>Candida rugosa</i> .....	72
8.3.1. Efecto de la concentración EDC-NHS .....	72
8.3.2. Efecto de la concentración de PEI <sub>1,3</sub> .....	73
8.3.3. Efecto del Triton X-100 sobre la actividad de la CRL .....	73
8.3.4. Estabilización de la CRL en presencia de polioles a pH 10 .....	73
8.3.5. Estabilización de la CRL en presencia de PEG a pH 10 .....	73
8.4. Agentes y condiciones de precipitación de la CRL .....	74
8.5. Estudio y desarrollo de la metodología de entrecruzamiento de la CRL con polietileniminas.....	74
8.5.1. Efecto del tiempo de incubación de la solución de EDC-HCl.....	74
8.5.2. Efecto de la concentración de agua durante el entrecruzamiento de BSA en un sistema acetonitrilo/agua .....	74
8.5.3. Efecto de la concentración de PEI en el entrecruzamiento de BSA en medio acuoso y en acetonitrilo/agua (80:20 v/v).....	75
8.5.4. Diseño factorial para la evaluación del efecto de la concentración de EDC y PEI en la efectividad de entrecruzamiento y el tamaño de los agregados proteínicos entrecruzados de BSA.....	75
8.5.5. Efecto de la concentración de PEI <sub>1,3</sub> en el entrecruzamiento de los CRL-CLEAs en acetonitrilo.....	76
8.5.6. Efecto de la concentración de EDC-NHS en el entrecruzamiento de los CRL-CLEAs con PEI <sub>1,3</sub> en acetonitrilo.....	76
8.5.7. Efecto de la concentración de BSA en el entrecruzamiento de los CRL-CLEAs con PEI <sub>1,3</sub> en acetonitrilo.....	77
8.5.8. Efecto de la concentración de trioctanoína en el entrecruzamiento de los CRL-CLEAs con PEI <sub>1,3</sub> en acetonitrilo.....	77
8.5.9. Efecto de la concentración de EDC-NHS en el entrecruzamiento de los CRL-CLEAs con PEI <sub>1,3</sub> en medio acuoso empleando como agente precipitante 64% p/v de sulfato de amonio .....	78
8.5.10. Preparación de CLEAs de las lipasas CALB y TLL entrecruzadas con PEI <sub>1,3</sub> en acetonitrilo .....	78
8.6. Efecto de diferentes condiciones de preparación en las propiedades de los CRL-CLEAs .....	79
8.6.1. Inmovilización de la CRL en forma de CLEAs por entrecruzamiento de sus grupos carboxilo con polietileniminas.....	79

---

8.6.2. Inmovilización de la CRL en forma de CLEAs por entrecruzamiento de sus grupos amino con glutaraldehído.....	80
8.6.3. Termoestabilidad .....	80
8.6.4. Morfología de los CLEAs.....	81
8.6.5. Estabilidad en solventes orgánicos .....	81
8.7. Preparación de derivados inmovilizados de la CRL sobre soportes de agarosa.....	81
8.7.1. Inmovilización de la CRL sobre soporte BrCN – agarosa .....	81
8.7.2. Inmovilización de la CRL sobre soporte octil – agarosa.....	82
8.7.3. Inmovilización de la CRL sobre soporte Naftil – agarosa.....	82
8.7.4. Inmovilización de la CRL sobre soporte glioxil – agarosa.....	83
8.7.5. Inmovilización de la CRL sobre soporte MANAE – agarosa .....	84
8.7.6. Inmovilización de la CRL sobre soporte GA – agarosa .....	85
8.8. Modificación química y/o física de los derivados inmovilizados de la CRL.....	86
8.8.1. Aminación de los grupos carboxilo de la enzima inmovilizada .....	86
8.8.2. Succinilación de los grupos amino de la enzima inmovilizada .....	86
8.8.3. Modificación de los grupos amino de la enzima inmovilizada por adición de cadenas alifáticas en los residuos de lisinas .....	87
8.8.4. Recubrimiento con PEI.....	87
8.9. Estudio de la enantioselectividad de los diferentes derivados de la CRL .....	87
8.9.1. Hidrólisis del ácido 2- <i>O</i> -buritil-2-fenilacético (BFA).....	87
8.9.2. Hidrólisis enantioselectiva del 1-feniletíl acetato (FEA).....	88
8.9.3. Hidrólisis enantioselectiva del 2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo (HFBE).....	89
8.10. Aplicación de los derivados inmovilizados de la CRL en la hidrólisis del aceite de sardina.....	90
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	91
9.1. Selección de agente y condiciones de precipitación de la CRL .....	92
9.2. Desarrollo de la metodología de entrecruzamiento de la CRL con polietileniminas .....	94
9.2.1. Protocolo general de inmovilización de enzimas en forma de CLEAs por entrecruzamiento de sus grupos carboxilo con polietileniminas .....	106
9.3. Evaluación de las propiedades catalíticas de CRL-CLEAs bajo diferentes condiciones de preparación.....	107
9.3.1. Grado de entrecruzamiento.....	108
9.3.2. Adición de BSA como mejorador del entrecruzamiento .....	111

---

9.3.3. Efecto de la longitud de cadena del agente de entrecruzamiento .....	114
9.3.4. Comparación de los CLEAs entrecruzados vía amino vs vía carboxilo .....	119
9.4. Inmovilización de la CRL sobre soportes de agarosa.....	120
9.5. Estabilidad de los derivados de la CRL inmovilizados en forma de CLEAs y sobre soportes de agarosa .....	126
9.5.1. Estabilidad térmica de los derivados de la CRL inmovilizados en forma de CLEAs y sobre soportes de agarosa .....	127
9.5.2. Estabilidad en solventes orgánicos de los derivados de la CRL inmovilizados en forma de CLEAs y sobre soportes de agarosa .....	129
9.6. Modulación de la enantioselectividad de la CRL y sus derivados inmovilizados.....	132
9.6.1. Hidrólisis enantioselectiva del 1-feniletíl acetato (FEA).....	132
9.6.2. Hidrólisis enantioselectiva del 2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo (HFBE).....	136
9.7. Aplicación de los derivados de la CRL en la hidrólisis del aceite de sardina .....	145
10. CONCLUSIONES .....	148
11. REFERENCIAS.....	151

## i. RESUMEN

La propuesta del presente proyecto se centró en la construcción de enzimas inmovilizadas en forma de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) empleando como agentes de entrecruzamiento polímeros multiaminados. Dicho mecanismo de unión se llevó a cabo mediante la formación de enlaces amida a partir de los grupos carboxilo libres de las enzimas y los grupos amino de los agentes de entrecruzamiento empleados. Para ello, los grupos carboxilo fueron previamente activados con la adición de una mezcla 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) para volverse capaces de reaccionar con grupos amino. Como enzima modelo de estudio se seleccionó a la lipasa de *Candida rugosa* (CRL). En nuestro conocimiento, es la primera vez que se llevó a cabo el entrecruzamiento propuesto para la preparación de CLEAs.

El primer paso consistió en la selección de un agente de precipitación. El acetonitrilo fue elegido ya que presentó la mayor capacidad precipitante de la CRL, y además tuvo el menor efecto desnaturalizante. Posteriormente, se estudiaron las variables más importantes que rigen el entrecruzamiento de proteínas mediante el mecanismo propuesto. Dentro de las cuales se encontraron: 1) La concentración de agua presente en el medio de reacción cuando éste es un solvente orgánico, 2) El pH cuando el medio de entrecruzamiento es acuoso, 3) La concentración de EDC-NHS, 4) La adición de albúmina sérica bovina (BSA) como fuente proteica externa, y 5) La adición de trioctanoína como sustrato de *bioimprinting* para la conservación y protección del sitio catalítico en su forma activa durante el entrecruzamiento (la adición de trioctanoína 0.28 mM permitió recuperar CLEAs con el doble de actividad específica).

Además de los CLEAs de la CRL (CRL-CLEAs), se prepararon CLEAs de las lipasas comerciales de *Candida antarctica* B (CALB) y *Thermomyces lanuginosus* (TLL). Todos estos biocatalizadores expresaron alrededor del 20-26% de la actividad inmovilizada en forma de CLEAs. La mayor actividad residual en los CRL-CLEAs fue del 15% de la inicial. La pérdida de actividad de los CLEAs de lipasas entrecruzados vía sus grupos carboxilo (carboxi-CLEAs) se relacionó con el proceso de entrecruzamiento de los grupos carboxilo de la enzima.

Una vez establecida la metodología general de preparación de CLEAs, se evaluó el efecto de las condiciones de preparación en las propiedades catalíticas de éstos biocatalizadores. Dentro de las variables estudiadas se encontró que la concentración de EDC/NHS, la adición de BSA y el tamaño de la polietilenimina (PEI) tienen un fuerte impacto en la morfología, actividad específica, termoestabilidad y enantioselectividad de los CLEAs. En esta etapa los CLEAs

preparados con EDC/NHS 28 mM, BSA (10 mg) y PEI<sub>1.3</sub>, fueron seleccionados como los biocatalizadores más robustos ya que fueron más activos, estables y enantioselectivos. Dichos CLEAs fueron 1.3 veces más activos y más termoestables que los CLEAs preparados por el método tradicional de entrecruzamiento con glutaraldehído. Como reacción modelo de estudio para la evaluación de la enantioselectividad se probaron los diferentes CLEAs en la resolución del (*S*)-ácido mandélico a partir de la mezcla racémica del ácido 2-*O*-butiril-2-fenilacético. En esta reacción modelo, los CRL-CLEAs alcanzaron un 91% de exceso enantiomérico en la resolución del (*S*)-ácido mandélico.

Como parte complementaria al presente proyecto se prepararon derivados inmovilizados de CRL sobre soportes persistentes de agarosa para su comparación con los derivados de la CRL en forma de CLEAs. Una vez obtenidos todos los derivados de la CRL inmovilizados con y sin soporte se procedió a evaluar su estabilidad. El derivado más termoestable a 50°C fue la CRL inmovilizada sobre glioxil-agarosa (glioxil-CRL) que retuvo el 85% de su actividad inicial por 150 h bajo las condiciones probadas. Por su estabilidad frente al etanol al 40%, los derivados más estables fueron el CLEA entrecruzado con glutaraldehído (amino-CLEA) y el glioxil-CRL (50 y 60% de actividad residual después de 97 h de tratamiento, respectivamente). Mientras que por su estabilidad en ciclohexano el derivado más estable fue la CRL inmovilizada en naftil-agarosa (naftil-CRL) (300% de actividad residual después de 100 h de tratamiento).

Posteriormente se aplicaron los biocatalizadores preparados con y sin soporte en la resolución de dos sustratos enantioméricos, (*S*)-1-feniletanol y (*R*)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo. Mediante la mezcla de los diversos protocolos de inmovilización, las modificaciones químicas y físicas de la enzima, así como las diferentes condiciones de reacción probadas, permitieron la obtención de al menos un biocatalizador que presentara una alta enantioselectividad ( $E > 20$ ) en cada una de las dos resoluciones enantioméricas estudiadas.

Como otra parte complementaria a este proyecto se aplicaron los derivados de la CRL preparados en la hidrólisis del aceite de sardina para la liberación selectiva de los ácidos eicosapentaenólico (EPA) y docosahexaenólico (DHA). En esta aplicación los CRL-CLEAs mostraron la mayor y selectividad EPA/DHA.

---

---

## ii. ABSTRACT

The present work was focused on the design and production of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) employing amino-containing polymers as cross-linkers. The enzyme was covalently bound by the amide bond formation between carboxyl-activated groups of enzyme and the amino groups of the cross-linkers. The free carboxyl groups of the enzyme were first activated with carbodiimide (EDC)-succinimide (NHS) in organic medium, and then the activated protein was cross-linked with different polyethyleneimines (PEIs). The lipase from *Candida rugosa* (CRL) was selected as protein model. To our knowledge, this is the first report of CLEAs produced by using amino-containing polymers as cross-linkers.

Acetonitrile was chosen as precipitant agent due to its lower denaturing effect on CRL. The most important variables that govern the protein cross-linking based on the proposed mechanism were identified: i) the water concentration in the reaction medium when it is an organic solvent, ii) the pH when the cross-linking process is carried out in an aqueous medium, iii) the EDC-NHS concentration, iv) the addition of bovine serum albumin (BSA), and v) the addition of trioctanoin as bioimprinting substrate for the conservation and protection of the active-site pocket (the addition of 0.28 mM trioctanoína provided 2-fold CLEAs activity).

In addition to CLEAs of CRL (CRL-CLEAs), CLEAs of other lipases, *Candida antarctica* B (CALB) and *Thermomyces lanuginosus* (TLL), were prepared. All the biocatalysts showed 20-26% of the activity found with the free enzyme. The highest activity found in the CRL-CLEAs represented 15% of the initial lipase activity. The loss of activity during the cross-linking via their carboxyl groups (carboxy-CLEAs) is related to the process of cross-linking the carboxyl groups of the enzyme.

Once the general preparation procedure for CLEAs was established, the effect of the preparation conditions on the catalytic properties of these biocatalysts was evaluated. The effect of the cross-linker chain length, the amount of added BSA, and EDC-NHS concentrations on the catalytic properties of resulting cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) were investigated. The CLEAs' size, shape, specific activity, activity recovery, thermostability and enantioselectivity significantly varied according to the preparation procedure. The most robust CLEAs were obtained with 1.3 kDa polyethyleneimine as cross-linker, 10 mg of BSA and 28 mM of EDC-NHS. This preparation was 1.3-fold more active and more thermostable than CLEAs prepared by the traditional method of amino cross-linking with glutaraldehyde, and retained 60% of residual

activity after 22 h at 50°C. Additionally, the CRL-CLEA preparation showed an enantioselectivity of 91% enantiomeric excess (*ee*) in the resolution of (*S*)-mandelic acid.

As a complement of the present project, immobilized derivatives of CRL on agarose-based supports were prepared; and then were compared against CRL-CLEAs. After the production of all CRL-derivatives with or without support, their stability was evaluated. The most thermostable derivative was the one immobilized on glyoxyl-agarose (glyoxyl-CRL) retaining 85% of residual activity after 150 h under the tested conditions. Due to their stability against ethanol at 40%, the more stable derivatives were the glutaraldehyde-cross-linked CLEA (amino-CLEA) and glyoxyl-CRL (50 and 60% of residual activity after 97 h of treatment, respectively). Whilst, due to their stability against cyclohexane at 50%, the more stable biocatalyst was the one immobilized on naphthyl-agarose (naphthyl-CRL) (300% of residual activity after 100 h of treatment).

Afterwards, the carrier-free and carried-bond biocatalysts were tested in the resolution of two enantiomeric substrates, (*S*)-1-phenylethanol and (*R*)-2-hydroxy-4-phenyl ethylbutyrate. By mixing different immobilization protocols, chemical and physical modification of enzymes and varied reaction conditions, the achievement of at least one high enantioselective biocatalyst ( $E > 20$ ) in the tested resolutions were attained.

Finally, the biocatalysts were applied in the production of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) during the sardine oil hydrolysis. In this application, the CRL-CLEAs showed the highest EPA/DHA selectivity.

# 1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas tienen importantes aplicaciones biotecnológicas debido a que la biocatálisis enzimática juega un rol muy importante en una gran variedad de industrias como la energética, la de alimentos y la química (Andualema & Gessesse, 2012; Ferreira-Dias *et al.*, 2013; Hasan *et al.*, 2006). Sin embargo, para que su uso sea rentable a nivel industrial, se requiere que se encuentren en un estado que permita su fácil manejo, operación, estabilidad y reutilización. Dichos requerimientos se han podido solventar con diversas técnicas, entre ellas, la inmovilización de enzimas (Adlercreutz, 2013; Brady & Jordaan, 2009; Hanefeld *et al.*, 2009; Palomo *et al.*, 2007b; Stepankova *et al.*, 2013). Los métodos de inmovilización que son libres de soportes están ganando cada vez mayor importancia debido a las ventajas que presentan (Cao *et al.*, 2003; Mateo *et al.*, 2004; Roessl *et al.*, 2010; Sheldon & Van Pelt, 2013; Talekar *et al.*, 2013).

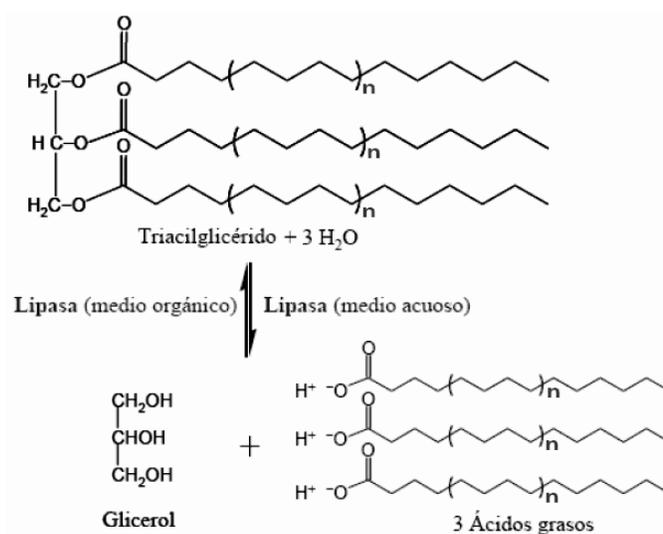
Como alternativa al entrecruzamiento tradicional con glutaraldehído durante la preparación de CLEAs, se desarrolló una metodología de inmovilización en donde se llevó a cabo el entrecruzamiento de los grupos carboxilo activados de las enzimas con polímeros multiaminados. Para ello, se seleccionó a la lipasa de *Candida rugosa* (CRL) como enzima modelo de estudio. Una vez establecidas las condiciones de preparación de los CLEAs, se evaluó el efecto de diferentes condiciones de preparación en las propiedades catalíticas y morfológicas de los CLEAs.

Con fines comparativos, también se prepararon derivados inmovilizados de la CRL sobre soportes persistentes de agarosa que permitieran diferentes orientaciones de la enzima sobre el soporte. Así mismo, se le realizaron distintas modificaciones químicas y físicas de todos los derivados preparados con y sin soportes. Todos estos biocatalizadores fueron comparados entre sí. Para ello, primero se evaluó su estabilidad frente a varias condiciones desestabilizantes. Posteriormente, se estudió su enantioselectividad en la resolución de dos sustratos enantioméricos, el (*S*)-1-feniletanol, y el (*R*)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo. Durante esta última aplicación, también se evaluó el efecto de la ingeniería del medio de reacción en la enantioselectividad de los biocatalizadores producidos. Como parte adicional a este trabajo, todos los biocatalizadores preparados se probaron en la reacción de hidrólisis del aceite de sardina para la producción selectiva del ácido eicosapentaenóico (EPA) y el ácido docosahexaenóico (DHA).

## 2. MARCO TEÓRICO

## 2.1. Lipasas

Las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas, E.C. 3.1.1.3) y esterases (éster hidrolasas E.C. 3.1.1.1) son enzimas clasificadas como carboxil éster hidrolasas ya que son capaces de romper los enlaces éster presentes en una molécula al encontrarse en un medio acuoso (Fig. 1). Ambas actúan sobre el mismo tipo de enlace, sin embargo, las esterases hidrolizan solamente sustratos de cadena corta que generalmente son solubles en agua, mientras que las lipasas también hidrolizan sustratos insolubles generalmente moléculas de cadena larga como los triglicéridos que son sus sustratos naturales (Bornscheuer & Kazlauskas, 2006c). Dependiendo de la enzima y del grado de hidrólisis de los triglicéridos, los ácidos grasos esterificados al esqueleto de glicerol se liberan produciendo diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos libres y glicerol.



**Figura 1.** Hidrólisis y síntesis de triacilglicéridos mediante lipasas (Sánchez, 2007).

En medios con solventes orgánicos, con bajo contenido de agua, estas enzimas pueden catalizar la reacción inversa, es decir la síntesis. Ejemplos de esto son las reacciones de alcoholisis y transesterificación a partir de alcoholes y ésteres, así como la síntesis de ésteres a partir de alcoholes y ácidos grasos libres (Kumar & Gross, 2000). También pueden catalizar reacciones de interesterificación y síntesis estereoespecífica de ésteres, así como actuar sobre un amplio rango de sustratos (Akoh *et al.*, 2008).

Existen varios criterios para diferenciar una lipasa de una esterasa (Tabla 1); sin embargo, sólo uno de ellos es empleado actualmente para definir a una lipasa.

**Tabla 1. Diferencias entre lipasas y esterases** (Ali *et al.*, 2012)

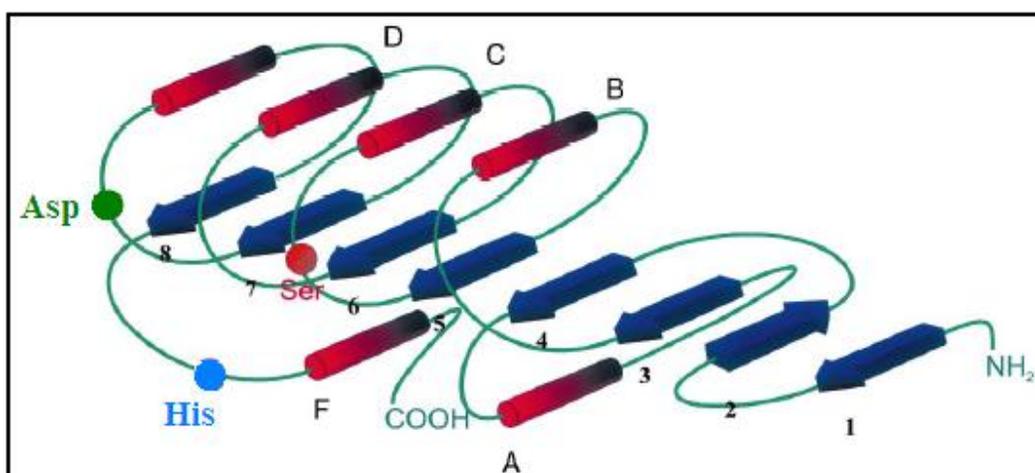
Criterio	Esterasa	Lipasa
Presencia de una tapa anfipática, Activación interfacial	No presentan activación interfacial (Verger, 1997)	Tienen una tapa cubriendo su sitio catalítico y presentan activación al contacto con la interfase aceite/agua
Solubilidad de los sustratos	Ésteres de cadena corta solubles ó parcialmente solubles en agua	Ésteres insolubles o parcialmente solubles en agua
Longitud de cadena de los sustratos	No presentan actividad sobre sustratos de cadenas largas. Sólo presentan actividad con sustratos de cadena corta	Presentan actividad sobre sustratos de cadenas largas mayores a 10 carbonos. Sin embargo, también presentan actividad sobre sustratos de cadenas cortas

En un principio se había establecido que las lipasas verdaderas eran aquellas que cumplían con los primeros dos criterios de la tabla 1, es decir: 1) que presentaran el fenómeno llamado “actividad interfacial”, esto es un incremento de su actividad en presencia de una interfase lípido-agua (Sarda & Desnuelle, 1958), y 2) que presentaran una tapa cubriendo su sitio catalítico (Brzozowski *et al.*, 1991; Derewenda *et al.*, 1992). En la actualidad se sabe que la presencia de una tapa en la estructura de las lipasas no necesariamente está relacionada con la activación interfacial (Verger, 1997). Existen lipasas que, a pesar de contar con una tapa anfipática que cubre sus sitios catalíticos, no presentan activación interfacial; como ejemplo de ellas están las de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* y *Candida antarctica* (Jaeger & Reetz, 1998). También se han encontrado algunas lipasas, como la cutinasa de *F. solani* y la lipasa de *B. subtilis* (Van Pouderoyen *et al.*, 2001) que no presentan esta “tapa”.

Debido a estos hallazgos actualmente el mejor criterio para diferenciar una lipasa de una esterasa es que las primeras presentan actividad tanto sobre ésteres de cadena corta así como triglicéridos de cadena larga, (usando como referencia la trioleína) mientras que las esterases sólo tienen actividad sobre la parte soluble de ésteres de cadenas cortas (como referencia la tributirina) (Jaeger *et al.*, 1999; Verger, 1997) y no pueden llevar a cabo la hidrólisis de sustratos de cadenas largas como la trioctanoína ó el vinilaurato (Bornscheuer & Kazlauskas, 2006c). Con esta diferencia establecida, una lipasa verdadera es una carboxilestera que cataliza la hidrólisis y la síntesis de acilglicerol de cadena larga, en donde se puede utilizar como estándar el triglicérido de oleína (Ali *et al.*, 2012; Chahiniana & Sarda, 2009; Jaeger & Eggert, 2002).

### 2.1.1. Estructura

Las lipasas y las esterasas son serin hidrolasas. El patrón de plegamiento común de todas las lipasas es una estructura tridimensional de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas (Ollis *et al.*, 1992). Consiste en una hoja  $\beta$  central que cuenta con 8 hojas paralelas, exceptuando a la segunda que es anti paralela. Las secciones  $\beta 3$  a  $\beta 8$  están conectadas por hélices  $\alpha$ , las cuales están unidas a cada lado de la hoja  $\beta$  central (Fig. 2). De acuerdo con estudios realizados por cristalografía de rayos X se sabe que el sitio catalítico se localiza en el carboxilo terminal de la hoja  $\beta$  central, el cual comprende a la triada catalítica: un residuo nucleófilo (Ser, Cys o Asp), un residuo ácido (Asp o Glu) y un residuo de histidina. Estos residuos ocurren en el mismo orden en todas las secuencias de aminoácidos de las lipasas y las orientan en la misma manera tridimensional.



**Figura 2.** Estructura del plegamiento de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas. En flechas azules se presentan las 8 láminas  $\beta$ , las  $\alpha$ -hélices en columnas rojas (Bornscheuer, 2002b).

En las lipasas bacterianas, el nucleófilo es el residuo de serina que se localiza en un motivo altamente conservado (Gly-X-Ser-X-Gly). Este motivo forma parte de una hebra  $\beta$  seguida por un giro rígido que contiene al residuo de serina y, en seguida, una hélice  $\alpha$ . A este arreglo se le conoce como  $\beta$ - $\epsilon$ Ser- $\alpha$  (Derewenda & Sharp, 1993). Este arreglo estructural posiciona al residuo nucleófilo en la superficie del sitio activo y permite acceder fácilmente por un lado al residuo de histidina y por el otro al sustrato. El segundo residuo catalítico (Asp) está localizado en el asa que conecta la hebra  $\beta 7$  con la hélice  $\alpha E$ , mientras que la histidina, el tercer residuo catalítico, se encuentra en un asa que sigue a la hebra  $\beta 8$  de la hoja central (Fig. 2).

Otra característica estructural encontrada en varias lipasas es el dominio correspondiente a la “tapa” del sitio activo. Éste generalmente consiste en una hélice corta de carácter anfipático que está formada por un giro (Grochulski *et al.*, 1994b) y una o dos hélices  $\alpha$  ((Brzozowski *et al.*, 1991; Derewenda *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1997; Schrag *et al.*, 1997). Se ha encontrado que este dominio puede abrirse o cerrarse en presencia de una superficie hidrófoba, como ocurre con la lipasa *Rhizomucor miehei* (RML), que al estar abierto deja expuesta a la triada catalítica, así como una gran superficie hidrófoba de aproximadamente  $750\text{\AA}^2$  (Brockman *et al.*, 1973) en la que se encuentran principalmente doce aminoácidos: Ile85, Trp88, Ile89, Leu92, Phe94, Val205, Leu208, Phe213, Val254, Leu255, Leu258 y Leu267 (Brzozowski *et al.*, 1991; Derewenda *et al.*, 1992). Estos aminoácidos están altamente conservados de acuerdo con las alineaciones de secuencia con otras lipasas conocidas, lo que confirma su importancia funcional en la interacción con la interfase lipídica. La mayoría de las lipasas bacterianas también presentan un dominio similar que cubre sus sitios activos (Jaeger *et al.*, 1999).

### 2.1.2. Fuentes de obtención

De acuerdo a su origen, las lipasas se pueden obtener de las siguientes fuentes (Akoh *et al.*, 2008):

- De origen animal: son lipasas provenientes de mamíferos (bovinos y porcinos, principalmente) localizadas en órganos y tejidos como páncreas, corazón, cerebro, tejido adiposo y sangre. Dentro de este tipo se encuentran lipasas que han sido ampliamente utilizadas en síntesis orgánica, tales como: la lipasa pancreática y gástrica humana y la porcina.
- De origen vegetal: estas lipasas provienen de semillas de oleaginosas. Son relativamente específicas para los triacilgliceroles nativos de las especies de las que se aislaron. No han tenido el mismo impacto que las provenientes de otras fuentes. Un ejemplo de éstas es la lipasa de *Carica papaya*.
- De origen microbiano: estas lipasas provienen de bacterias, levaduras y hongos. Tienen un gran interés debido a su uso biotecnológico, ambiental, farmacéutico y sus aplicaciones industriales. Varían en especificidad, actividad específica, estabilidad a diferentes rangos de temperatura y otras propiedades. En general, son más termoestables que las provenientes de animales y vegetales. Dentro de las lipasas fúngicas podemos encontrar a las provenientes de levaduras como *Candida rugosa* (CRL), *Candida antarctica* B (CALB), *Candida antarctica* A (CALA), *Geotrichum candidum* (GCL) y *Yarrowia lypolitica* (YLL), y de hongos filamentosos como *Thermomyces lanuginosus* (TLL), *Rhizomucor miehei* (RML), *Penicillium camemberti*,

*Rhizopus oryzae* (ROL), *Aspergillus niger* (ANL), *Fusarium solani*, entre otras. Dentro de las lipasas de origen bacteriano se hallan las provenientes de *Pseudomonas glumae*, *Burkholderia cepacia* ó *Pseudomonas cepacia* (PCL), *Pseudomonas pseudoalcaligenes* y *Chromobacterium viscosum* (Akoh *et al.*, 2008; Kirk & Christensen, 2002; Xu, 2000).

Actualmente podemos encontrar un gran número de lipasas disponibles comercialmente, siendo Novo Nordisk (>50%), Genecor (35%) y Solvay las compañías internacionales que las producen en mayor cantidad (Akoh *et al.*, 2008).

### 2.1.3. Usos en la industria

Las lipasas exhiben propiedades catalíticas específicas que las hacen muy atractivas para aplicaciones biotecnológicas, particularmente en aquellas relacionadas con su regio- y enantioselectividad (Kovac *et al.*, 2000).

Las lipasas microbianas tienen una gran relevancia práctica ya que se han encontrado numerosas aplicaciones en industrias como la de alimentos, pieles, fármacos, cosméticos, energética, etc. También han sido extensivamente usadas en la industria láctea para la hidrólisis de grasa de leche. Se ha desarrollado un amplio rango de preparaciones de lipasas microbianas, como las de RML, ANL y *A. oryzae*, para la industria de producción de quesos, de jugos de fruta, alimentos horneados y fermentación de vegetales (Heidt *et al.*, 1996). Son también utilizadas en la síntesis de antioxidantes como el L-ascorbil laurato (Chang *et al.*, 2009) que es un ácido graso derivado del ácido ascórbico y puede ser ampliamente utilizado como un antioxidante natural en el contenido lípido de productos alimenticios y cosméticos. Así mismo, se han utilizado las lipasas para la síntesis de monoésteres de fructosa utilizados como emulsificantes para productos como mayonesas, cremas, salchichas y helados (Afach *et al.*, 2008). Las lipasas 1,3-específicas han mostrado un gran potencial para la preparación de lípidos estructurados, como los sustitutos de manteca de cacao (Bektaş *et al.*, 2008) y sustitutos de lípidos de leche humana, Betapol® (Şahin *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2003). A su vez, se han empleado para la modificación de aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados de alto valor agregado, como el araquidónico, eicosapentaenóico, docosahexaenóico y algunos otros (Osborn & Akoh, 2002; Speranza & Macedo, 2012). Se han reportado beneficios terapéuticos y nutricionales en muchos de los ácidos grasos n-3 poliinsaturados. En la industria farmacéutica, las lipasas se han empleado para la preparación y modificación de fármacos; ejemplos de éstos son los compuestos quirales como los antiinflamatorios, prostaglandinas, cefalosporinas, penicilinas, entre otros (Casas-Godoy *et al.*, 2012). Las lipasas también han mostrado ser activas

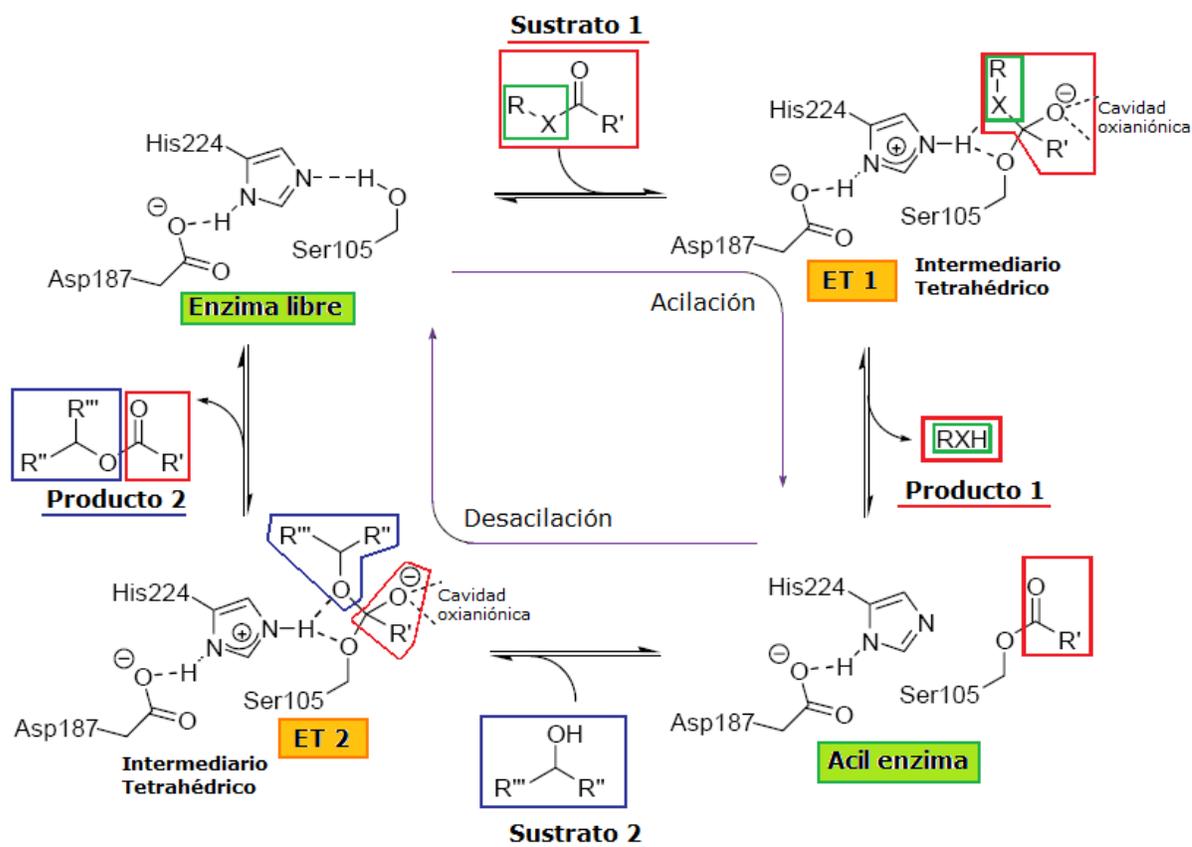
en solventes orgánicos, esta propiedad les permite ser ampliamente utilizadas como biocatalizadores en síntesis orgánica, además de que permiten la síntesis de intermediarios enantioméricamente puros que son difíciles de obtener mediante procesos químicos (Adlercreutz, 2013; Kovac *et al.*, 2000; Sharma & Kanwar, 2014). Así mismo las lipasas se han empleado para la preparación de combustibles a partir de fuentes renovables como el biodiesel (Christopher *et al.*, 2014). Entre otras importantes y prometedoras aplicaciones de las lipasas, se encuentra la fabricación de detergentes, en donde su principal acción es la remoción por hidrólisis del material graso indeseado (Hasan *et al.*, 2006), así como también en el tratamiento de desechos acuosos con alto contenido graso (Jurado *et al.*, 2008).

#### 2.1.4. Mecanismo catalítico

Las lipasas pueden llevar a cabo una gran variedad de reacciones en las que está presente el enlace éster; entre ellas podemos diferenciar las reacciones de síntesis y de hidrólisis. Las primeras se favorecen en medios orgánicos, con baja actividad acuosa (Rendón *et al.*, 2001). Para cualquier reacción existe un óptimo de actividad enzimática a un valor específico de  $a_w$ . Las enzimas suspendidas en un solvente orgánico son menos activas que las enzimas disueltas en agua (Bornscheuer & Kazlauskas, 2006a); sin embargo, las lipasas conservan su actividad en medios orgánicos gracias a que establecen interacciones entre la fase inorgánica y la región hidrofóbica de la enzima, así como entre sus residuos hidrofílicos y el agua, lo que permite a las lipasas mantener una forma tridimensional estable y activa (Miller *et al.*, 1991).

El mecanismo químico de la hidrólisis de lípidos catalizado por estas enzimas fue descrito por Jaeger *et al.* (1999). Tanto la hidrólisis como la síntesis se llevan a cabo en varios pasos. Primero, comienza con el ataque nucleofílico del átomo de oxígeno procedente del grupo hidroxilo del residuo nucleofílico de serina al carbono del grupo carbonilo del enlace éster del primer sustrato (Fig. 3). Con esto se da la formación de un intermediario tetraédrico, que se caracteriza por tener una carga negativa en el oxígeno del grupo carbonilo y que es estabilizado por interacciones con un macrodipolo producido por la hélice  $\alpha C$  y por puentes de hidrógeno entre el átomo de oxígeno del grupo carbonilo cargado negativamente y por lo menos con dos grupos NH de la cadena principal (conocido como “cavidad oxianiónica”). Uno de los grupos NH proviene de un residuo que se encuentra detrás de la serina nucleofílica y el otro del residuo final de la hoja  $\beta 3$ . El ataque nucleofílico de la serina es incrementado por una histidina catalítica, a la que le es transferido el protón del grupo hidroxilo de la serina. Esta transferencia es facilitada por la presencia de un ácido catalítico que orienta el anillo imidazol de la histidina y

neutraliza parcialmente la carga generada en él. A continuación, este protón es donado al oxígeno del enlace éster el cual se rompe de esta forma para formar al primer producto, que es un alcohol en caso de ser la hidrólisis de un éster. En esta etapa, el componente ácido del sustrato es esterificado por la serina nucleofílica (intermediario tetraédrico covalente), mientras se libera el primer producto. La siguiente etapa continúa con un paso de desacilación, en la que un segundo sustrato en caso de síntesis ó una molécula de agua en el caso de hidrólisis; hidroliza el intermediario covalente. La histidina catalítica activa a esta molécula de agua o segundo sustrato quitándole un protón. El ión  $\text{OH}^-$  resultante ataca al carbono carbonilo del grupo acilo unido covalentemente a la serina. En este paso se vuelve a formar un intermediario tetraédrico transitorio que es estabilizado por interacciones con la cavidad oxianiónica. Posteriormente, la histidina dona un protón al oxígeno del residuo activo de serina, el cual libera a su vez el componente acilo, formando el segundo producto, que es un ácido carboxílico cuando se trata de la hidrólisis. Después de la difusión de este ácido carboxílico la enzima queda lista para realizar otra ronda de catálisis.



**Figura 3.** Mecanismo de reacción de la CALB. En la síntesis, la esterificación o transesterificación envuelve dos estados de transición, ET1 y ET2, y un intermediario acil enzima (Ottosson, 2001; Rotticci, 2000). En la hidrólisis el producto 1 es un alcohol, el producto 2 es un ácido carboxílico y el sustrato 2 es el agua (Jaeger *et al.*, 1999).

Una de las ventajas de presentar actividad en medios orgánicos es la posibilidad de cambiar la selectividad de las lipasas empleando diferentes solventes, a lo que se llama ingeniería de solventes o ingeniería del medio (Bornscheuer & Kazlauskas, 2006a). Dentro de las reacciones de síntesis, podemos encontrar a la esterificación y la interesterificación. La primera ocurre cuando un alcohol y un ácido carboxílico se unen para formar un éster, mientras que la segunda es la reacción de transferencia o intercambio de los grupos acilo entre un éster y un alcohol, alcoholólisis; ó entre un éster y un ácido carboxílico, acidólisis; ó entre un éster y otro éster con diferentes sustituyentes, transesterificación (Osborn & Akoh, 2002; Rousseau & Marangoni, 2008; Willis & Marangoni, 2008).

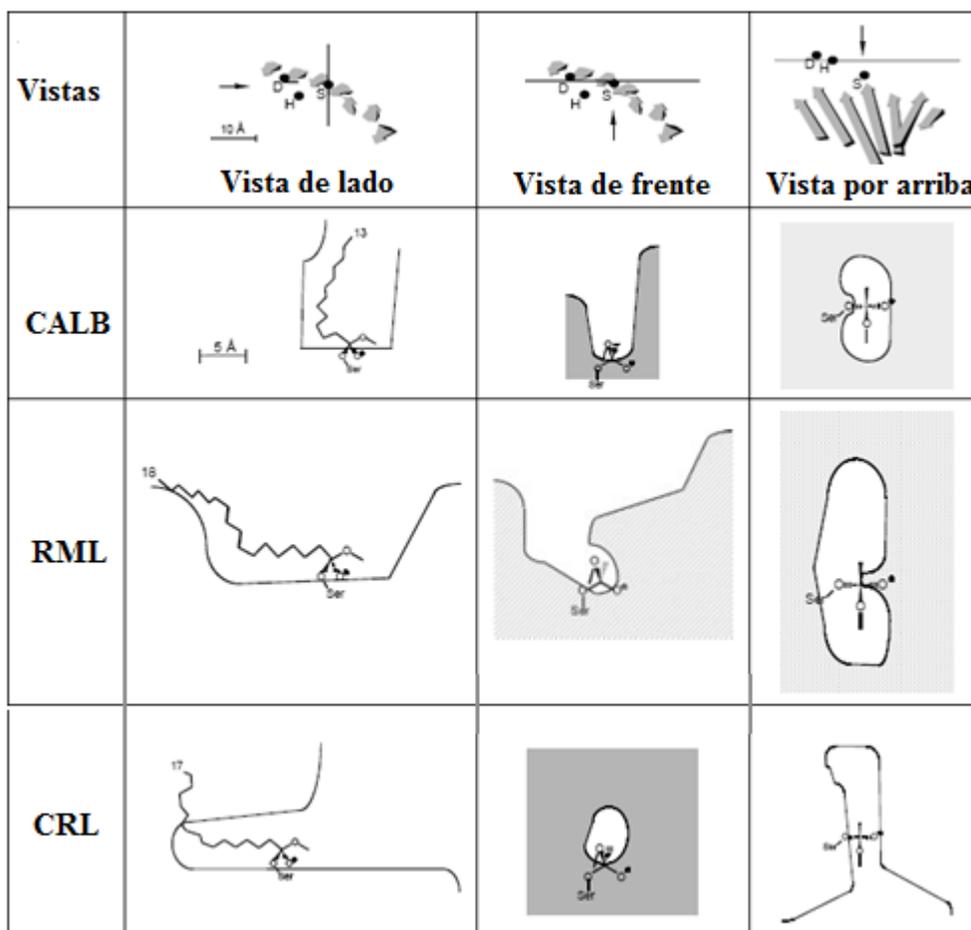
La reacción de hidrólisis se favorece cuando existe un exceso de agua (Klibanov, 1997), y consiste en la descomposición de un éster en una molécula de ácido carboxílico y una de alcohol. La hidrólisis lipolítica de triglicéridos emulsificados tiene una gran importancia práctica que representa una alternativa más atractiva para la producción de ácidos grasos que su producción vía síntesis química. Adicionalmente, las emulsiones de triglicéridos (aceite/agua) constituyen un entorno en el cual las lipasas ejercen su actividad catalítica. El tratamiento de desechos acuosos con alto contenido graso, así como la eliminación de grasas en procesos de lavado son importantes y prometedoras aplicaciones de estas enzimas (Jurado *et al.*, 2008).

Casi todas las lipasas tienen actividad en un amplio intervalo de pH y temperatura; generalmente presentan actividad máxima a un pH entre 7 y 9 y a una temperatura de 30 a 60°C. Se ha encontrado que su actividad óptima se obtiene en emulsiones donde se pueden obtener elevadas áreas superficiales del sustrato. Las lipasas no sólo son activas en emulsiones en fase normal (aceite/agua), sino que también pueden presentar una mejor actividad en emulsiones invertidas (agua/aceite) y en sistemas micelares inversos (micro-emulsiones). En la naturaleza, las lipasas disponibles de diferentes fuentes presentan variaciones considerables en su especificidad para ciertas reacciones. Esta propiedad es generalmente referida como especificidad enzimática, así pues las lipasas presentan al menos cuatro tipos de especificidad: regioselectividad, acilselectividad, enantioselectividad y quimoselectividad (Velasco-Lozano *et al.*, 2012).

#### **2.1.5. Sitio de unión del sustrato en lipasas**

Mediante estructuras cristalinas de los estados de transición del complejo inhibidor-enzima obtenidas por rayos X se han identificado diferentes tipos de sitios de unión para las porciones ácidas y alcohólicas de los ésteres. El sitio de unión de la fracción alcohólica es similar en todas

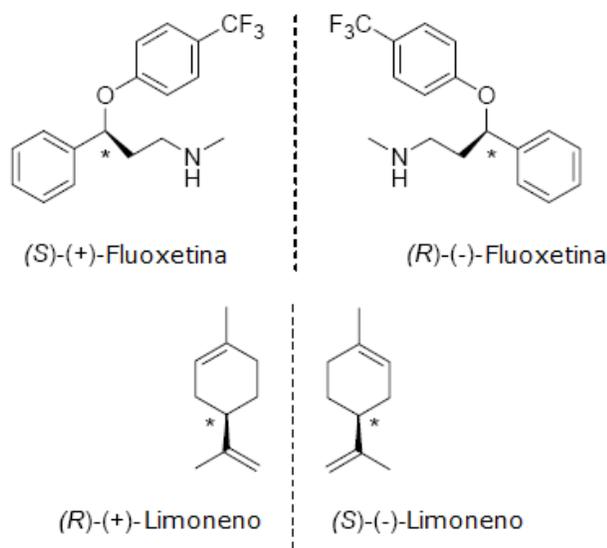
las lipasas. Es una cavidad que contiene dos regiones: un hueco largo hidrofóbico que se abre en presencia de solventes y un hueco pequeño que mira hacia el piso de la cavidad. La forma de esta cavidad modula la enantioselectividad de las lipasas hacia alcoholes secundarios. El sitio de unión para la fracción ácida del éster varía considerablemente entre cada lipasa, encontrando tres diferentes tipos de sitios de unión: 1) tipo embudo como las de la CALB y la PCL, las lipasas pancreáticas de mamíferos y la cutinasa, 2) tipo cavidad hidrofóbica en donde el sitio de unión se localiza cerca de la superficie de la proteína como las de la RML y la ROL; y 3) tipo túnel largo, en donde se puede acomodar una molécula de longitud de hasta dieciocho carbonos, como el que presenta la CRL. (Fig. 4). En los tres tipos de estructura el carbono  $\alpha$  de la cadena de acilo se une justo debajo de la región larga hidrofóbica en donde se une la parte del alcohol. Sustituyentes en el carbono  $\alpha$  pueden extenderse en la cavidad hidrofóbica (Bornscheuer & Kazlauskas, 2006c).



**Figura 4.** Forma del sitio de unión al sustrato de tres diferentes lipasas. D, Asp; H, His y S, Ser. La dirección de la vista está indicada por una flecha. Los números indican el ácido graso de mayor longitud que permite completar la cavidad dentro del sitio de unión (Pleiss *et al.*, 1998).

## 2.2. Quiralidad

En la naturaleza existen muchas moléculas quirales. Un objeto quiral se define como aquel cuya imagen especular no se superpone. Ejemplos de este tipo de objetos son nuestros pares de manos y pies. Las moléculas que tienen pares con este tipo de propiedades se llaman enantiómeros (Fig. 5). Sin embargo, los enantiómeros presentan propiedades físicas idénticas en ambientes no quirales.



**Figura 5.** Ejemplos de moléculas quirales. Las dos imágenes especulares en cada par son enantiómeros a los cuales se les llama *S* o *R*. Los asteriscos marcan el estereocentro responsable de la asimetría de la molécula (Rotticci, 2000).

Los ambientes quirales son aquellos en los que una sustancia con enantiómeros presenta diferencias funcionales específicas; tal es el caso del limoneno que genera diferentes respuestas fisiológicas en nuestro cuerpo. El (*S*)-limoneno es percibido como una fragancia a limón, mientras que el otro enantiómero, el (*R*)-limoneno, es percibido como una fragancia a naranja. En el campo de los fármacos quirales, generalmente sólo uno de los enantiómeros es el que presenta actividad biológica, mientras que el otro no tiene ningún efecto en el cuerpo humano. Tal es el caso del omeprazol, cuyo isómero *S* presenta gran capacidad para el tratamiento de la úlcera gástrica, mientras que el isómero *R* no tiene ningún efecto. Sin embargo, existen enantiómeros que no sólo son inactivos, sino que además son tóxicos, como el (*S*)-etambutol que es empleado para el tratamiento de la tuberculosis, mientras que el isómero *R* causa ceguera (Ottoson, 2001). Debido a estas diferencias, el desarrollo de fármacos enantiopuros cada vez tiene mayor interés y crecimiento en el mercado global (Fig. 6). Se espera que el mercado global

de la tecnología quiral aumente un 6.5% del año 2011 al año 2016, lo que representa un total de 7.2 billones de dólares. Dentro de este mercado, la síntesis de compuestos quirales ocupa el mayor campo, el cual proyecta alcanzar los 5.7 billones de dólares para el año 2016.

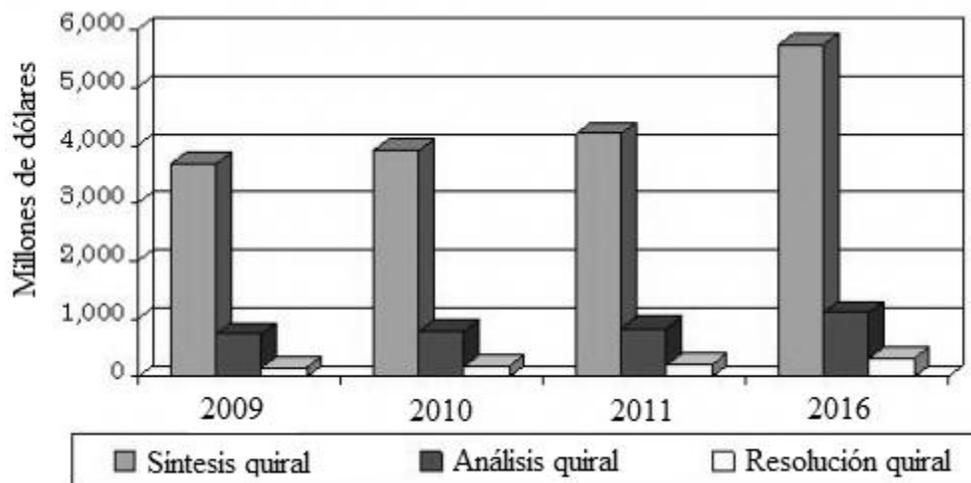


Figura 6. Mercado global de la tecnología quiral (Shalini S., 2012).

### 2.2.1. Enantioselectividad

Muchas lipasas son capaces de diferenciar entre sustratos que contienen enantiómeros, cuando se trata de sustratos quirales, e incluso diferenciar entre las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de triglicéridos proquirales, estereoselectividad. La enantioselectividad y la estereoselectividad de las lipasas ha permitido darles un gran número de aplicaciones en la preparación de lípidos estructurados, resolución de mezclas racémicas y síntesis de compuestos ópticamente activos (Klibanov, 2001). Por ejemplo, sólo la forma (*S*)- del éster metílico del ácido 2-metilbutanóico (principal componente de sabor de las manzanas y fresas) tiene la característica de ser un sabor frutal. Se ha investigado la habilidad de numerosas lipasas para catalizar la síntesis selectiva enantiomérica del éster metílico del ácido (*S*)-2-metilbutanóico, encontrando buenos resultados para las lipasas de RML, ANL y *Aspergillus javanicus* (Kwon *et al.*, 2000).

La pureza enantiomérica se describe con el exceso enantiomérico (*ee*) y puede ser calculada de acuerdo a la ecuación 1:

$$ee = \frac{\text{moles del enantiómero mayoritario} - \text{moles del enantiómero minoritario}}{\text{moles totales de ambos enantiómeros}} \quad (\text{Ec. 1})$$

Para poder comparar los valores de  $ee$  en diferentes condiciones de reacción se requieren los mismos niveles de conversión. Los enantiómeros son sustratos que compiten por el sitio catalítico de la enzima y cuyas tasas de reacción se pueden definir con la ecuación 2:

$$E = \frac{(k_{cat}/K_M)_R}{(k_{cat}/K_M)_S} \quad (\text{Ec. 2})$$

La relación de las constantes específicas  $(k_{cat}/K_M)_R/(k_{cat}/K_M)_S$  es referida como la relación enantiomérica,  $E$ , la cual es independiente del grado de conversión. El valor  $E$  determina la enantioselectividad de la reacción ya que es una constante que mide la habilidad de una enzima bajo determinadas condiciones de reacción para distinguir entre enantiómeros, así el valor  $E$  es utilizado en vez de  $ee$  para describir la enantioselectividad de una reacción (Chen *et al.*, 1982).

Durante el curso de una resolución enzimática se puede apreciar que a bajos niveles de conversión se tiene una mezcla casi racémica de sustratos, es decir un  $ee_s$  muy bajo, y prácticamente sólo se cataliza la conversión del enantiómero preferido, resultando en un gran  $ee_p$ . En el caso de reacciones irreversibles, cuando la reacción avanza la concentración del enantiómero preferido decrece, con lo que la concentración del otro enantiómero se eleva aumentando sus posibilidades de ser convertido,  $ee_s$  incrementa mientras que  $ee_p$  disminuye (Fig. 7A) (Ottosson, 2001).

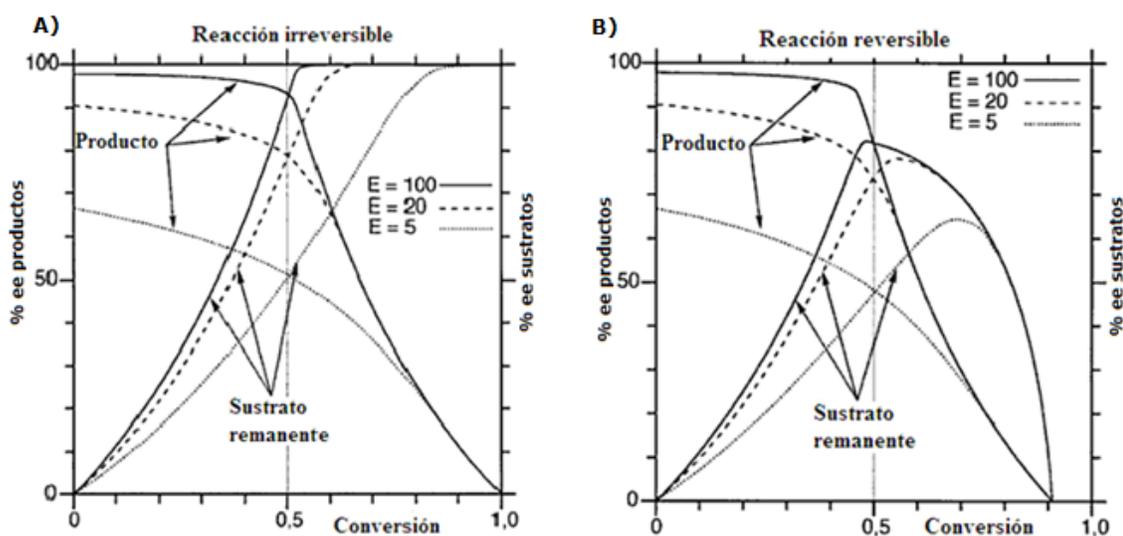


Figura 7. Gráfica de avance de reacciones enantioméricas, A) irreversible y B) reversible (Carrera & Riva, 2008).

Sin embargo, cuando se trata de reacciones reversibles, al 50% de conversión se puede obtener un gran  $ee$  de productos y sustratos, pero si se avanza en la reacción, los productos regresan a ser sustratos y de nuevo los  $ee$  disminuyen (Fig. 7B). La estimación de  $E$  en un solo punto de  $ee_s$  ó  $ee_p$  a un sólo valor de conversión es muchas veces poco confiable ya que a menudo la determinación del porcentaje de conversión carece de exactitud.

Existen tres ecuaciones que permiten calcular el valor de  $E$ . El empleo de cada una de ellas depende de los parámetros de reacción que se monitoreen. Durante una reacción se puede monitorear exceso enantiomérico de sustratos ( $ee_s$ ), el exceso enantiomérico de productos ( $ee_p$ ) y el porcentaje de conversión ( $c$ ). Sin embargo, no siempre se pueden monitorear los tres. Para reacciones irreversibles, la ecuación 3 introducida por Rakels (Rakels *et al.*, 1993) permite calcular el valor de  $E$  con mayor exactitud debido a que no involucra el porcentaje de conversión el cual es más complicado de medir que ambos  $ee$ :

$$E = \frac{\ln\left[\frac{1-ee_s}{1+ee_s/ee_p}\right]}{\ln\left[\frac{1+ee_s}{1+ee_s/ee_p}\right]} \quad (\text{Ec. 3})$$

Sin embargo, cuando no es posible monitorear ambos  $ee$  (sustratos y productos), se puede emplear la ecuación descrita por Chen *et al.* (1982) la cual permite calcular  $E$  a partir de la conversión ( $c$ ) y el  $ee_p$  (Ec. 4). En la ecuación anterior, el impacto del error en la estimación de la conversión tiene poco efecto en el valor de  $E$  cuando se determina a niveles bajos de conversión (Rotticci, 2000).

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_p)]}{\ln[(1-c)(1+ee_p)]} \quad (\text{Ec. 4})$$

Un valor de  $E$  igual a 1, significa que se trata de una reacción no específica, cuando obtenemos valores de 0 a 15, significa que no son adecuadas para propósitos prácticos. Valores de  $E$  entre 15 y 20 son moderadamente buenos, y cuando están por encima de 30 son excelentes para la síntesis (Bornscheuer & Kazlauskas, 2006b; Rotticci, 2000).

## 2.2.2. Factores que modifican la enantioselectividad

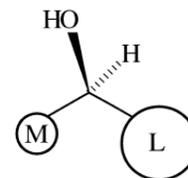
La enantioselectividad de una reacción enzimática depende de las condiciones de reacción y también está influenciada por la estructura del sustrato, el tipo de catalizador y el medio de reacción (Ottoson, 2001). En general, se puede ordenar a estos factores como se describe a continuación.

### 2.2.2.1. Tamaño de los sustituyentes: Regla de Kazlauskas

Tamaño del grupo saliente ó fracción acilo.

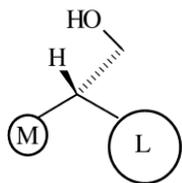
*Para los alcoholes secundarios:* Una lipasa siempre resolverá más rápidamente (mayor  $k_{cat}$ ) un enantiómero en donde uno de los sustituyentes del estereocentro sea más grande, por lo que alcoholes secundarios con grupos similares en tamaño serán desfavorecidos (Fig. 8). Aprovechando este hecho, varios investigadores han incrementado la enantioselectividad de lipasas aumentando la longitud de la cadena de alguno de los sustituyentes del alcohol secundario para hacer más grande la diferencia de tamaños entre ellos (Gupta & Kazlauskas, 1993; Kazlauskas *et al.*, 1991; Rotticci *et al.*, 1997). Una estrategia similar logró revertir la enantioselectividad convirtiendo el sustituyente mediano del medio en uno largo (Shimizu *et al.*, 1992). En general la enantioselectividad aumenta conforme lo hace la longitud de cadena del grupo acilo, con excepción de las cadenas muy largas (Rotticci, 2000). La CALB ha demostrado ser la más enantioselectiva sobre alcoholes secundarios, en contraste con la CRL, que no logra estos resultados (Bornscheuer & Kazlauskas, 2006c).

**Figura 8.** Regla empírica para predecir cuál enantiómero de un alcohol secundario reaccionará más rápido en una reacción catalizada por lipasas. M, sustituyente de tamaño mediano por ejemplo metilo; L, sustituyente de tamaño largo por ejemplo fenilo. En las reacciones de acilación, el enantiómero mostrado es que el que reacciona más rápido; en reacciones de hidrólisis, el éster del enantiómero mostrado reacciona más rápido (Bornscheuer & Kazlauskas, 2006c; Kovac *et al.*, 2000).



*Para alcoholes primarios:* En general las lipasas presentan menor enantioselectividad sobre alcoholes primarios que sobre alcoholes secundarios. Sólo las lipasas pancreática porcina (PPL) y la PCL presentan gran enantioselectividad sobre alcoholes primarios (Bornscheuer & Kazlauskas, 2006c). Para poder predecir la enantioselectividad de este tipo de sustratos, existe una regla similar a la de Kazlauskas pero en sentido contrario (Weissfloch & Kazlauskas, 1995),

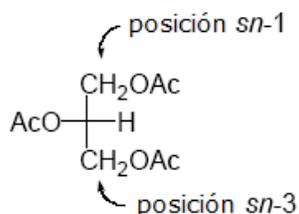
es decir que el enantiómero favorecido en un alcohol primario será el que posea el menor tamaño de cadena en sus sustituyentes (Fig. 9).



**Figura 9.** Regla empírica para predecir la enantioselectividad de una lipasa sobre alcoholes primarios quirales. Esta regla es confiable sólo cuando el estereocentro carece de un átomo de oxígeno. M, sustituyente de tamaño mediano; L, sustituyente de tamaño largo (Kovac *et al.*, 2000).

La enantioselectividad opuesta sobre alcoholes primarios se puede atribuir a que el grupo  $\text{CH}_2$  extra introduce un pliegue entre el estereocentro y el oxígeno, con lo que ambos sustituyentes, el mediano y el largo, se unen en la misma cavidad del sitio catalítico en ambos casos. Esta regla no es confiable para alcoholes primarios con un oxígeno unido a su estereocentro (Kovac *et al.*, 2000). Desafortunadamente no se puede emplear la misma estrategia de aumentar o disminuir el tamaño de los sustituyentes para aumentar la enantioselectividad, ya que algunas veces añadiendo sustituyentes más largos la enantioselectividad aumenta (Lampe *et al.*, 1996), otras disminuye y algunas veces permanece sin cambios (Weissfloch & Kazlauskas, 1995).

*Para triacilglicéridos:* Siendo los triglicéridos los sustratos naturales de las lipasas, muchos investigadores han estudiado la estereoselectividad de estas enzimas sobre ellos. La estereoselectividad de las lipasas hacia los triglicéridos se basa en la habilidad que tienen éstas para discriminar entre las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 (Fig. 10).



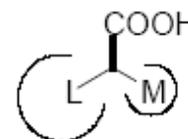
**Figura 10.** Numeración estereoquímica de los triglicéridos (Bornscheuer & Kazlauskas, 2006c).

La estereoespecificidad sobre las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 varía entre diferentes lipasas y triglicéridos. En general, las que presentan mayor especificidad sobre la posición *sn*-1 son las provenientes de *Pseudomonas* sp., y la RML; mientras que la lipasa gástrica humana presenta mayor especificidad sobre la posición *sn*-3. Del mismo modo existen lipasas que no presentan

preferencia sobre alguna de las dos posiciones, como las de la CRL y la PPL (Rogalska *et al.*, 1993). La selectividad sobre este tipo de sustratos también puede variar con la tensión interfacial. Los grupos sustituyentes presentes en la posición *sn*-2 de los triglicéridos juegan un papel decisivo en el reconocimiento quiral de las lipasas (Kovac *et al.*, 2000). Esto se debe al grado de torsión de la molécula con cada sustituyente, así (Holzwarth *et al.*, 1997) demostraron que la ROL tiene mayor preferencia sobre la posición *sn*-1 cuando el ángulo de torsión del glicerol es  $>150^\circ$ , mientras que si es  $<150^\circ$  la lipasa se vuelve *sn*-3 selectiva.

*Para ácidos carboxílicos con estereocentros en la posición  $\alpha$ :* Para este tipo de sustratos la lipasa que presenta mayor enantioselectividad es la CRL, mientras que la CALB es muy poco enantioselectiva, caso contrario a los resultados obtenidos con alcoholes secundarios. Existe una regla empírica que puede explicar y predecir el enantiómero más favorecido cuando se trata de ácidos carboxílicos (Fig. 11).

**Figura 11.** Regla para predecir el enantiómero favorecido en ácidos carboxílicos con la CRL, L, sustituyente largo; M, sustituyente mediano (Ahmed *et al.*, 1994; Franssen *et al.*, 1996).



La estructura de rayos X de la CRL sugiere que el sustituyente largo, L, se une al sitio en forma de túnel, mientras que el estereocentro se encuentra en la boca de este túnel (Botta *et al.*, 1997; Holmquist *et al.*, 1996). Existen algunas excepciones que surgen cuando el sustituyente largo es excesivamente ramificado y no puede embonar bien a lo largo del túnel, por lo que un modo alternativo de unión con el sustrato fuera del túnel favorece al enantiómero opuesto.

*Para ácidos carboxílicos con estereocentros en la posición  $\beta$ :* En este tipo de sustratos el estereocentro se encuentra más lejos, y una gran cantidad de lipasas pueden catalizar este tipo de compuestos con gran enantioselectividad (Bornscheuer & Kazlauskas, 2006c).

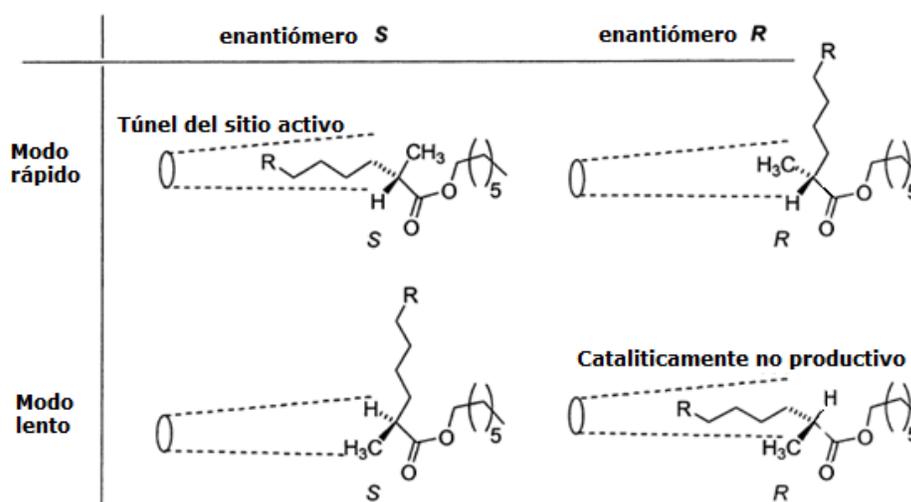
#### 2.2.2.2. Estructura del sustrato: Impedimentos estéricos

Los impedimentos estéricos son los factores más importantes en la enantioselectividad de las lipasas; sin embargo, los efectos electrónicos también contribuyen (Bornscheuer & Kazlauskas, 2006c).

El trabajo de Cygler (Cygler *et al.*, 1994) permitió mostrar los sitios de unión de los dos enantiómeros del mentol en la CRL. En la catálisis de ambos enantiómeros (el lento y el rápido)

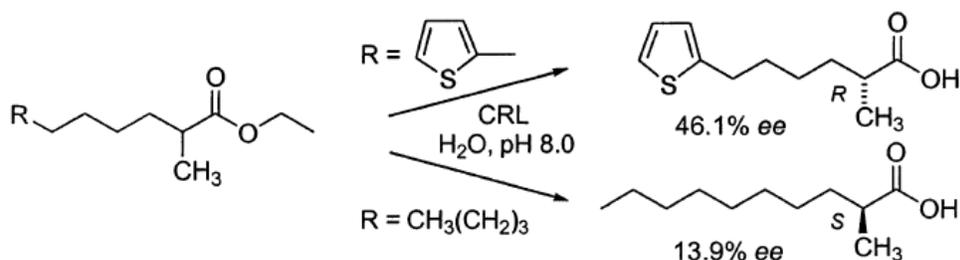
se pudo observar que la lipasa unía el sustituyente más largo del mentol a la cavidad más larga de las dos que presenta su sitio catalítico; mientras que el sustituyente mediano siempre era unido a la cavidad pequeña del sitio catalítico; es decir que en cuanto a  $K_m$  (constante de afinidad enzima sustrato) no se encontraban muchas diferencias entre los enantiómeros; sin embargo lo que los diferenciaba eran sus tasas de reacción  $K_{cat}$ .

La mayor conversión de uno u otro de los dos enantiómeros del mentol, se debía a que cuando el enantiómero *S* se acoplaba al sitio catalítico, el oxígeno nucleofílico del mentol se orienta hacia la histidina 449 catalítica formando un puente de hidrógeno, mientras que el enantiómero *R* no permite la formación de este puente de hidrógeno ya que el oxígeno queda orientado en dirección contraria. El tipo de unión enzima sustrato de la CRL, que es una lipasa larga con un peso molecular de 60 kDa, sugiere que existen diferentes modos de unir a las moléculas de los sustratos enantioméricos (Holmquist *et al.*, 1996), es decir, que un mismo sustrato enantiomérico puede adoptar diferentes orientaciones al momento de unirse con el sitio catalítico, resultando en tipos diferentes de unión (Fig. 12). El hecho de que los enantiómeros de un sustrato quiral puedan orientarse y unirse diferentemente al sitio activo de la lipasa, permite la adaptación de la enantioselectividad e incluso modular la preferencia enantiomérica de estas enzimas (Berglund, 2001). Esto puede ser logrado mediante ingeniería de las moléculas de sustrato basada en experimentos de modelado molecular.



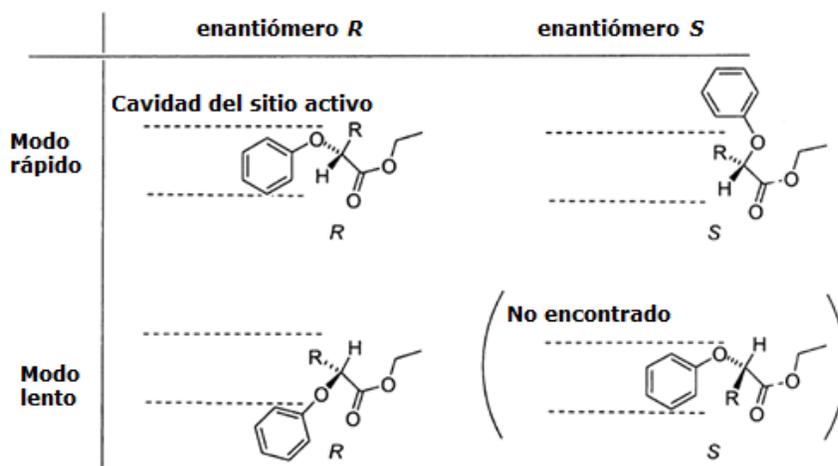
**Figura 12.** Modos de unión al sitio catalítico de la CRL para los enantiómeros del 1-heptil-2-metildecanoato ( $R$ =butilo) sugeridos por modelamiento molecular (Holmquist *et al.*, 1996). El túnel del sitio de unión se muestra esquemáticamente. La estrategia desarrollada para lograr invertir la preferencia enantiomérica envuelve el empleo de una cadena de acilo,  $R$ , más voluminosa, la cual dirige al enantiómero *S* hacia su forma de unión lenta (Berglund, 2001).

Uno de los modos de reactante lento del enantiómero *R* es un modo no productivo ya que el grupo metilo del sustrato distorsiona al residuo de histidina del sitio catalítico. El reactante rápido del enantiómero *S* formando un complejo con la enzima se puede predecir por modelado siendo el complejo con menor energía, de acuerdo con datos experimentales. Este hecho sugiere que si se emplea un enfoque de ingeniería de sustrato para bloquear su forma coordinada con el túnel del sitio activo, la lipasa podrá invertir su preferencia enantiomérica ya que el enantiómero *S* cambiará su forma del modo rápido hacia el modo lento de unión. Una prueba de lo anterior, se logró con la CRL llevando a cabo la hidrólisis de dos sustratos análogos, en los cuales se cambiaba el sustituyente de la cadena de acilo. En el primero, se colocó un grupo tienilo, y en el segundo una cadena lineal (Fig. 13). El primero se esperaba que estuviera estéricamente muy impedido para poder acomodar la cadena de acilo en el túnel del sitio catalítico, y el segundo si logró acomodarse en el túnel, lo que hizo revertir la enantioselectividad (Berglund *et al.*, 1998).



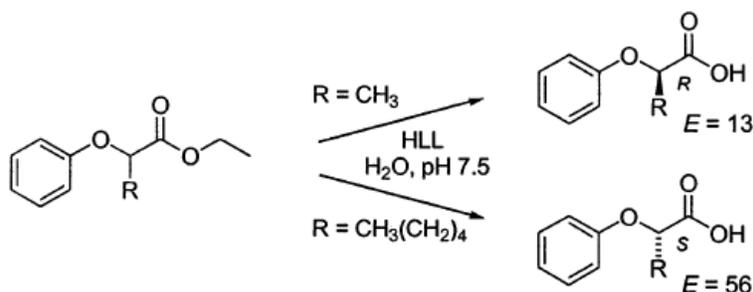
**Figura 13.** Hidrólisis de ésteres de etilo análogos catalizados por la CRL, se invirtió la enantioselectividad induciéndola con un grupo tienilo voluminoso (Berglund *et al.*, 1998).

El mismo efecto anterior se demostró con la TLL, que tiene un peso de 30 kDa y que a diferencia de la CRL su sitio catalítico es de forma de una superficie larga o hueco hidrofóbico (Fig. 14). Para que el sustituyente  $R=\text{CH}_3$  del enantiómero  $S_{\text{rápido}}$  se una al hueco hidrofóbico, se requiere que éste sustituyente  $R=\text{CH}_3$  sea más hidrofóbico que el anillo fenólico.



**Figura 14.** Modos de unión al sitio catalítico de la TLL del etil-2-fenoxipropanoato ( $R=CH_3$ ) obtenidos por modelado molecular (Berglund *et al.*, 1999). La estrategia para invertir la enantioselectividad envuelve un grupo alquilo, R, más voluminoso, el cual es más ventajoso en términos de energía de unión proporcionado por la cavidad hidrofóbica del sitio catalítico.

Para demostrar este fenómeno, se llevó a cabo la hidrólisis de dos sustratos análogos los cuales se diferenciaron en su grupo R, el primero tenía un grupo  $R=CH_3$  (menos hidrofóbico que el anillo bencílico), y el segundo  $R=CH_3(CH_2)_4$  (más hidrofóbico que el anillo bencílico). Se esperaba que el segundo sustituyente interactuara más con la superficie hidrofóbica del sitio catalítico de la TLL que el primero. Esta mayor interacción revertiría la enantioselectividad, ya que para que la forma del isómero  $R_{\text{rápido}}$  se una al hueco hidrofóbico de la enzima, es necesario que el anillo bencílico se una al hueco hidrofóbico; mientras que al no estar unido el anillo bencílico sino el grupo sustituyente  $R=CH_3(CH_2)_4$  la unión se va a la forma del enantiómero  $S_{\text{rápido}}$  (Fig. 15).



**Figura 15.** Hidrólisis ésteres de etilo análogos catalizada por la TLL, que muestran la inversión de la preferencia enantiomérica inducida por la voluminosa cadena de acilo hidrofóbica (Berglund *et al.*, 1999).

### 2.2.2.3. Actividad termodinámica del agua

La cantidad de agua en el medio de reacción determina la actividad termodinámica del agua y esta a su vez influye fuertemente en la tasa de reacción, y en menor medida en la enantioselectividad en reacciones enzimáticas en solventes orgánicos. Los solventes polares requieren típicamente de 1-3% de agua añadida para una actividad óptima, mientras que los solventes no polares requieren sólo de 0.05-1% de agua añadida. Las enzimas requieren esta mínima cantidad de agua para mantener su estructura y flexibilidad (Broos *et al.*, 1995; Rupley *et al.*, 1983).

El contenido de agua puede medirse con una titulación tipo Karl-Fischer, sin embargo, se sabe desde hace tiempo que la actividad de agua ( $a_w$ ) es una mejor medida de ésta, especialmente cuando se trabaja en diferentes condiciones de reacción. Los solventes polares requieren de mayor adición de agua que los solventes no polares debido a que los solventes polares compiten con la lipasa por el agua disponible. Para poder controlar la actividad acuosa en una reacción, se pueden añadir pares de sales, partículas de sílica gel, tamices moleculares, etc.

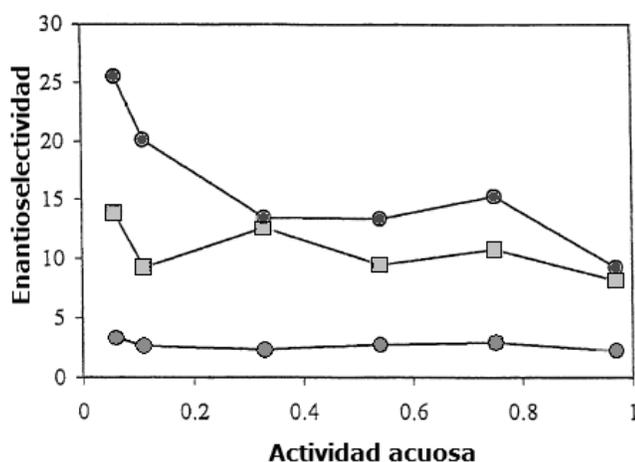
La actividad de agua también influye en la enantioselectividad de las reacciones catalizadas por lipasas, sin embargo, no lo hace de la misma manera. El efecto que tiene varía con los solventes empleados, también dependiendo si la fracción quiral del sustrato está en su parte del donador de acilo o en la parte alcohólica. En la resolución de los ácidos 2-metil alcanóicos con la CRL (Fig. 16) la enantioselectividad fue más alta a mayores valores de  $a_w$  (Berglund *et al.*, 1994; Hogberg *et al.*, 1993). Sin embargo, en la resolución de varios alcoholes secundarios, la actividad de agua tiene muy poco efecto sobre la enantioselectividad de la CALB (Hansen *et al.*, 1995; Orrenius *et al.*, 1995) ó la PCL (Bovara *et al.*, 1993).



**Figura 16.** Resolución del ácido 2-metil alcanóico con la CRL a diferentes  $a_w$  (Berglund *et al.*, 1994).

Para poder comparar el efecto de un disolvente en la enantioselectividad, es necesario llevar a cabo la comparación en las mismas condiciones de actividad de agua en los diferentes solventes; esto se debe a que la tasa de reacción enzimática depende, en gran medida, de la

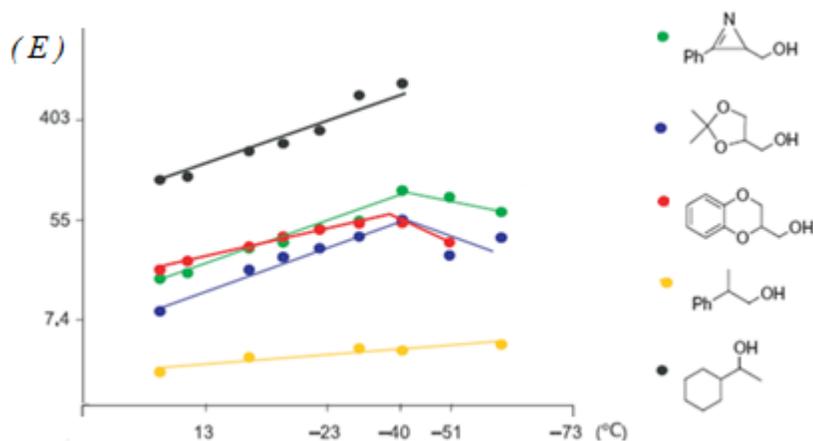
cantidad de agua disponible en el medio. Sin embargo, al momento de relacionar la enantioselectividad con el  $a_w$  encontramos casos en donde al disminuir o aumentar  $a_w$  disminuye  $E$ , y otros en donde al disminuir o aumentar  $a_w$   $E$  aumenta, y otros en donde disminuir o aumentar  $a_w$  no afecta  $E$  (Fig. 17). Este efecto puede explicarse por el efecto cinético tomando en cuenta los residuos del estereocentro en la parte alcohólica de un sustrato o en su parte del grupo acilo. El agua es un nucleófilo competitivo para el intermediario acil-enzima, se encuentra participando en un paso enantioselectivo de la reacción si la parte del grupo acilo de la acil-enzima es quiral (Berglund & Hult, 2000). Esto sugiere que al alterar el  $a_w$  conduce a alterar la enantioselectividad sólo en los casos en donde el sustrato cuente con una parte acilo quiral.



**Figura 17.** Efecto de la actividad de agua en la enantioselectividad para la esterificación del ácido fenilpropiónico (50 mM) con 1-heptanol (100 mM) en hexano. La enantioselectividad está definida como ( $S/R$ ) para la CRL (círculos oscuros), la ROL (cuadrados) y como ( $R/S$ ) para la CALB (círculos claros) (Modificado de (Persson *et al.*, 2002)).

#### 2.2.2.4. Temperatura

Disminuir la temperatura puede aumentar el valor de  $E$  (Sakai *et al.*, 1997). Sakai *et al.* (1997) incrementaron  $E=17$  a  $30^{\circ}\text{C}$  hasta  $E= 84-99$  a  $-40^{\circ}\text{C}$ , de la PCL en la acetilación del dietil éter. Más adelante, el mismo grupo de trabajo estudió el efecto de la temperatura en la resolución de 5 alcoholes (primarios y secundarios) con la PCL y encontraron que en todos los casos, al disminuir la temperatura aumentaba la enantioselectividad (Fig. 18), sin embargo, las tasas de reacción se veían seriamente disminuidas a estas temperaturas (Sakai, 2004).

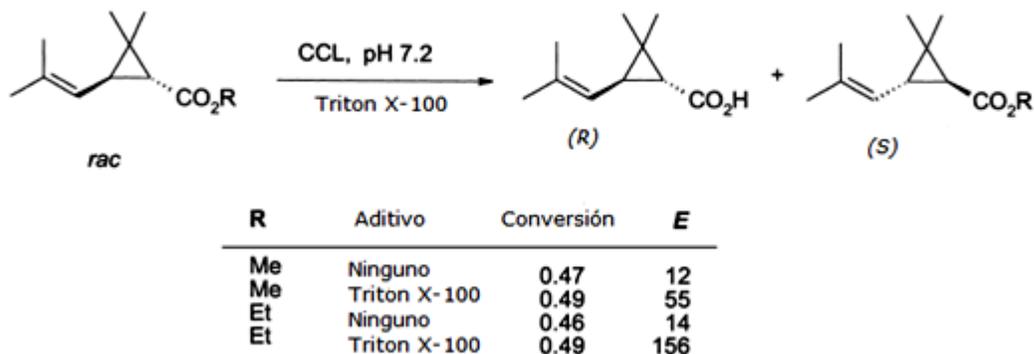


**Figura 18.** Efecto de la temperatura sobre la enantioselectividad en la resolución de alcoholes catalizadas por la PCL (Sakai, 2004).

No obstante, existen casos en donde aumentar la temperatura también puede incrementar el valor de  $E$ . Yasufuku y Ueji (1997) (Yasufuku & Ueji, 1997) lograron aumentar un  $E=5$  a  $10^{\circ}\text{C}$ , hasta un  $E=33$  a  $57^{\circ}\text{C}$  con la CRL en la reacción del ácido 2-fenoxipropiónico.

#### 2.2.2.5. Aditivos presentes en el medio de reacción

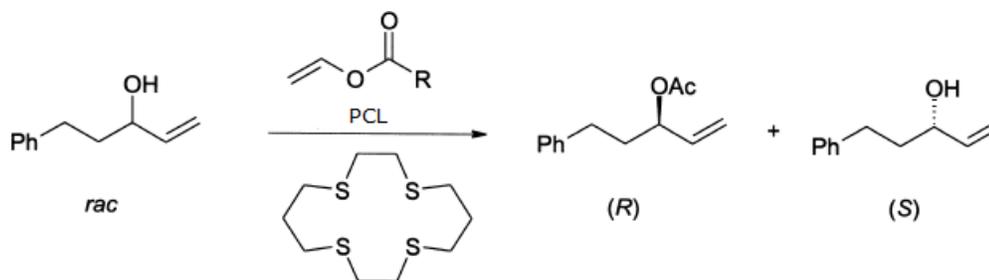
Se ha observado que el empleo de agentes surfactantes como los detergentes han mejorado la enantioselectividad de la mayoría de algunas reacciones catalizadas por lipasas (Fig. 19) (Theil, 2000). Sin embargo, algunos autores reportan una disminución de la enantioselectividad al emplear Triton X-100 (Salgin & Takaç, 2007).



**Figura 19.** Efecto del Triton X-100 (2%) en la enantioselectividad de la resolución de ésteres alquílicos del ácido *trans*-crisantémico catalizada por la lipasa de *Candida cylindracea* (CCL) (Rao *et al.*, 1994).

Del mismo modo, se ha observado que otros aditivos como los éteres cíclicos, particularmente el tio éter cíclico, mejora la reactividad y la selectividad de la PCL en la síntesis

enantioselectividad de ésteres carboxílicos. Como es el caso de la transesterificación con alcoholes alílicos racémicos usando una gran variedad de ésteres vinílicos (Fig. 20).



**Figura 20.** Síntesis enantioselectiva de ésteres carboxílicos en presencia de tio éter cíclico (Takagi *et al.*, 1997; Takagi *et al.*, 1996).

En la tabla 2 se puede observar cómo en la mayoría de los casos la adición de tio éter cíclico incrementa por mucho el valor de *E*. Algunos otros macrociclos han sido investigados y han mostrado casi no tener influencia en la selectividad de la reacción.

**Tabla 2.** Resolución cinética del alcohol alílico racémico con ésteres vinílicos catalizada por la PCL en presencia de 5% de tio éter cíclico (Takagi *et al.*, 1997; Takagi *et al.*, 1996).

R	Solvente	Aditivo	<i>E</i>
Me	Hexano	Ninguno	105
Me	Hexano	Tio éter cíclico	407
Me	<i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O	Ninguno	305
Me	<i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O	Tio éter cíclico	>1200
Et	<i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O	Ninguno	21
Et	<i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O	Tio éter cíclico	40
n-C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	<i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O	Ninguno	8
n-C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	<i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O	Tio éter cíclico	169
n-C <sub>13</sub> H <sub>27</sub>	<i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O	Ninguno	500
n-C <sub>13</sub> H <sub>27</sub>	<i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O	Tio éter cíclico	129

*i*-Pr<sub>2</sub>O: diisopropil éter

Los autores atribuyen este efecto a la formación de un complejo entre el alcohol alílico racémico y el tio éter cíclico, que modifica las propiedades del sustrato.

#### 2.2.2.6. Concentración del sustrato

Debido a que las reacciones de esterificación catalizadas por lipasas en medio orgánico son reversibles, es común usar un exceso de uno de los sustratos para desplazar la posición del equilibrio hacia la formación de productos. De esta manera, al aumentar la concentración de uno de los sustratos, se logra desplazar el equilibrio químico hacia la formación de productos y por lo

tanto esto resulta en un aumento del *ee* a altas tasas de conversión (Tabla 3); sin embargo, para algunos alcoholes y ácidos cuando se emplea la CRL se han reportado varios casos en donde al aumentar la concentración de uno de los sustratos se obtienen menores *ee*.

**Tabla 3.** Efecto de la concentración de alcohol en la enantioselectividad de la reacción de esterificación de ácidos quirales catalizada por la CRL (Berglund *et al.*, 1995; Wu & Liu, 2000).

Ácido	Conc. ácido (mM)	Alcohol	Conc. alcohol (mM)	<i>E</i>
	150		900	37 <sup>a</sup>
	150		150	70 <sup>a</sup>
	150		90	83 <sup>a</sup>
	150		900	67 <sup>a</sup>
	150		150	90 <sup>a</sup>
	150		90	100 <sup>a</sup>
	50		100	50 <sup>b</sup>
	50		50	90 <sup>b</sup>
	50		10	375 <sup>b</sup>
	50		1	350 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Reacción en ciclohexano. <sup>b</sup>Reacción en isooctano

El sitio de unión con el sustrato de la CRL presenta la forma de un túnel que se extiende desde el sitio de reacción hacia el interior de la enzima. Basándose en la estructura de rayos-X del complejo enzima-inhibidor, este túnel ha sido sugerido como el sitio de unión de la parte acilo del sustrato (Grochulski *et al.*, 1994a). Sin embargo, para dar una explicación a nivel molecular, para los datos observados en la tabla 3, un estudio de modelamiento molecular reveló dos posibles formas de unir el éster del ácido 2-metildecánico al sitio activo de la CRL (Grochulski *et al.*, 1994a; Hæffner & Norin, 1999; Holmquist *et al.*, 1996). En contraste con el enantiómero que reacciona más rápido, el enantiómero más lento deja el túnel vacío. Por lo tanto sugiere que el alcohol se coordina con el túnel e inhibe al enantiómero más rápido y no al enantiómero más lento. Por lo tanto, a concentraciones mayores de alcohol se puede disminuir la enantioselectividad. Las generalidades de este comportamiento para otras lipasas son aún desconocidas. Sin embargo, las moléculas de sustratos enantioméricos se unen en diferentes conformaciones en varias enzimas. Por lo tanto, se puede esperar que las tasas de reacción individuales sean influenciadas de manera diferente por un segundo sustrato no quiral y que el

fenómeno de inhibición enantiomérica no sea limitado sólo para enzimas que tengan un sitio de unión tipo túnel como la CRL (Berglund, 2001).

#### **2.2.2.7. Solventes**

El grupo de Klibanov propuso que cambios en la solvatación del complejo enzima sustrato afectan la enantioselectividad (Ke *et al.*, 1996; Rubio *et al.*, 1991). En este caso se trató de hacer una correlación con el valor de log P (el logaritmo del coeficiente de partición entre el *n*-octanol y el agua, valores menores a 2 incluyen solventes polares como el metanol, acetona, piridina y éter dietílico; valores de log P entre 2 y 4 son para solventes como el *n*-octanol, tolueno y *n*-hexano; valores de log P mayores a 4 son para solventes no polares como *n*-decano y el difeniléter). Para estimar la diferencia en solvatación, los autores usaron el valor de log P de cada solvente y encontraron una buena correlación con la enantioselectividad, sin embargo existen varios casos reportados que no cumplen con este supuesto, por lo que el valor de log P no puede predecir con exactitud el comportamiento de la enantioselectividad.

Varios investigadores sugieren que los solventes cambian la conformación del sitio activo por unión o por cercanía a ellos (Fitzpatrick *et al.*, 1993; Yennawar *et al.*, 1995). Gracias a la cristalografía de rayos X, pudieron identificar las moléculas de solventes como hexano y acetonitrilo unidas al sitio activo de una proteasa. Incluso solventes enantioméricos como la (*S*) y (*R*)-carbona modifican en un factor de hasta 8 veces la enantioselectividad de algunas lipasas como las CRL, RML y PSL (Ottolina *et al.*, 1994).

#### **2.2.2.8. Conformación tridimensional del sitio catalítico y de la estructura enzimática**

Aunado a la ingeniería del medio de reacción, la ingeniería del biocatalizador ha sido ampliamente empleada para la mejora de la enantioselectividad (Bornscheuer, 2002a; Kourist *et al.*, 2010; Mateo *et al.*, 2007b; Palomo, 2009). Dentro de este tipo de modificaciones encontramos dos grandes grupos: 1) la ingeniería conformacional, y 2) la ingeniería genética. El primero se basa en la modificación de la conformación del sitio catalítico mediante la inmovilización de enzimas. Gracias al diseño de una gran variedad de soportes y técnicas de inmovilización, se ha logrado la obtención de biocatalizadores con una enantioselectividad mejorada. Las diversas metodologías de inmovilización permiten la obtención de biocatalizadores que presentan selectividad diferente a la de la enzima nativa ya que modifican la rigidez y conformación del sitio catalítico, así como el microambiente que rodea a la enzima (Rodrigues *et al.*, 2013). Por otro lado, la ingeniería genética también permite la modificación de la estructura y conformación de la enzima y su sitio catalítico. Sin embargo, dichos cambios se

logran mediante la producción de enzimas a las que se les ha modificado su estructura primaria (Reetz, 2006). Estas modificaciones se han realizado vía mutagénesis aleatoria y/o mutagénesis dirigida. Dada la gran cantidad de mutantes resultantes de la modificación aleatoria, el diseño racional de este tipo de biocatalizadores está teniendo cada vez mayor importancia (Braiuca *et al.*, 2006; Illanes *et al.*, 2012; Otten *et al.*, 2010).

### 2.3. Inmovilización de enzimas

Las enzimas tienen un gran campo de importantes aplicaciones biotecnológicas (Bornscheuer *et al.*, 2012; Schmid *et al.*, 2001), sin embargo, para que su uso sea rentable a nivel industrial, se requiere que se encuentren en un estado que permita su fácil manejo, operación, estabilidad y reutilización (Bommarius & Paye, 2013). Con este fin, la inmovilización de enzimas a surgido como herramienta para adecuar a las enzimas a este tipo de procesos (Adlercreutz, 2013; Hanefeld *et al.*, 2009; Sheldon, 2007b).

La inmovilización está definida como el confinamiento de enzimas físicamente localizadas en una región definida del espacio, que retienen su actividad catalítica, pudiendo ser usadas repetida y continuamente (Guisán, 2006). Sin embargo, la inmovilización de enzimas debe cumplir con otros criterios para lograr la obtención de biocatalizadores robustos.

Los principales objetivos de la inmovilización se basan en la obtención de enzimas robustas (Tabla 4), es decir que cumplan con sus requerimientos no catalíticos (RNC), que son los que no tienen que ver con el sitio catalítico como la forma, tamaño, grosor, longitud, etc. que permiten su mejor aplicación y reutilización; y los requerimientos catalíticos (RC), que son los que están ligados a las propiedades catalíticas como los perfiles de actividad, selectividad, estabilidad, pH, temperatura, etc. (Cao, 2006d).

Existen dos estrategias para obtener enzimas robustas: 1) Diseñar procesos a partir de enzimas inmovilizadas disponibles, y 2) Diseñar enzimas inmovilizadas alrededor de los procesos disponibles. La segunda alternativa ha sido la más empleada (Cao, 2006d). A pesar de que hoy en día se cuenta con numerosas técnicas de inmovilización, aún no se han elucidado todas las bases fisicoquímicas de este fenómeno (Hanefeld *et al.*, 2009; Stepankova *et al.*, 2013). Por ello, actualmente se sigue fomentando la investigación enfocada hacia la comprensión y desarrollo de este tipo de técnicas que han presentado numerosas ventajas tecnológicas (Sheldon & Van Pelt, 2013).

**Tabla 4.** Criterios para la obtención de enzimas inmovilizadas robustas (Cao *et al.*, 2003).

Parámetro	Requerimiento	Beneficio
Funciones no catalíticas	Forma y tamaño adecuados Fabricación sencilla Alta estabilidad mecánica  Alta estabilidad química	Facilita separación, fácil control de reacción Flexibilidad del diseño del reactor Pocos cambios en la estructura interna No descomposición en la catálisis sólida, no contaminación
Funciones catalíticas	Alta actividad volumétrica (U/g) Alta selectividad  Amplia selectividad del sustrato Estabilidad en solventes orgánicos  Termoestabilidad  Estabilidad operacional Estabilidad conformacional	Alta productividad y rendimiento tiempo-espacio Menores reacciones alternas, fácil separación del producto, menos contaminaciones Tolerancia a variaciones estructurales del sustrato Cambiar el equilibrio de reacción con el uso de solventes orgánicos Reducción del tiempo de reacción aumentando temperatura Rentable para la producción de un compuesto Modulación de las propiedades de la enzima
Enzimas inmovilizadas	Reciclable Amplia aplicación Reproducible Diseño rápido y sencillo	Menor impacto en el costo del producto Tolerancia a variaciones del proceso Garantiza la calidad del producto Rápido acomodo en el proceso productivo
Consideraciones económicas y ecológicas	Bajo volumen Fácil eliminación Diseño racional Seguro de usar	Menor costo de manipulación Menor daño al medio ambiente Evita selecciones laboriosas Satisfacer las normas de seguridad
Derechos de propiedad intelectual	Innovador Atractivo Competitivo	Protección de los derechos de autor Concesión de licencias Fortalecimiento de su posición en el mercado

La inmovilización de enzimas afecta su conformación, rigidez y estado de agregación, motivo por el cual su reactividad y enantioselectividad se ven modificadas (Palomo *et al.*, 2002a). Gracias a esto la inmovilización surge como estrategia para modular la selectividad de las enzimas.

Dentro de las ventajas obtenidas con la inmovilización de enzimas, se pueden destacar: 1) El aumento de la estabilidad, como lo es la resistencia a altas temperaturas, condiciones de pH extremo, concentraciones altas de sustratos, estabilidad en solventes, agitación mecánica, etc., 2) La posibilidad de reutilización, 3) El aumento de la actividad, y 4) El aumento y modulación de la selectividad, como lo son la regio-, acilo-, quimo- y enantioselectividad (Brady & Jordaan, 2009; Cao *et al.*, 2003; Hanefeld *et al.*, 2009; Palomo *et al.*, 2007b).

### **2.3.1. Tipos de inmovilización**

Existen diferentes tipos de inmovilización de enzimas que de acuerdo al tipo de interacción entre el soporte y la proteína se pueden clasificar de la siguiente manera:

- A) Métodos del tipo interacción física: la enzima no sufre modificaciones estructurales ya que queda retenida físicamente por la estructura del soporte.
- B) Métodos del tipo interacción química: la enzima sufre modificaciones estructurales ya que queda retenida en la superficie y/o en el interior del soporte ó insolubilizada mediante enlaces covalentes que modifican su conformación, rigidez y estado de agregación (Palomo *et al.*, 2002a).

A continuación se presentan algunos ejemplos de cada uno de estos métodos.

#### **2.3.1.1. Adsorción**

Este método de inmovilización por interacción física se basa en las fuerzas de interacción que se pueden establecer entre una superficie o soporte y la enzima, son reversibles y no covalentes (Fig. 21 A). Dentro del tipo de interacciones que se han empleado están: 1) la interacción física no específica en la que la enzima es adsorbida vía fuerzas no específicas como las de van der Waals y puentes de hidrógeno, 2) adsorción bioespecífica, 3) interacciones electrostáticas y enlaces iónicos, así como también 4) interacciones hidrofóbicas (Cao, 2006a).

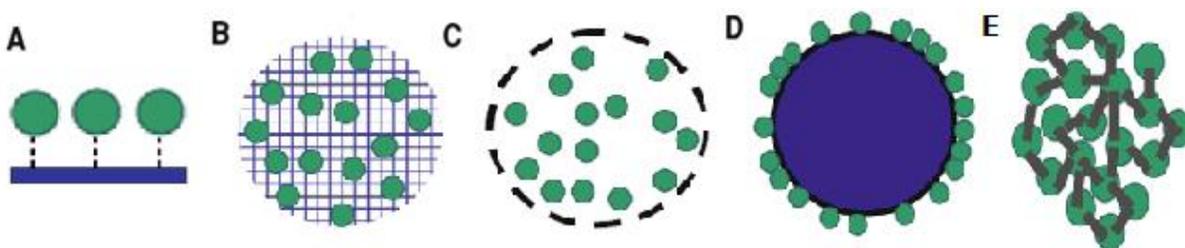
#### **2.3.1.2. Atrapamiento**

Es un método que se define como el proceso por el cual las enzimas quedan embebidas en una matriz ya sea física o químicamente y es logrado típicamente empleando redes de polímeros como polímeros orgánicos o sol-gel y usualmente realizado *in situ* (Sheldon, 2007a) (Fig. 21 B). Las moléculas de enzima pueden ser embebidas física o covalentemente a la matriz, por lo que este tipo de inmovilización cuando es covalente se puede clasificar como atrapamiento químico (Cao, 2006c). El atrapamiento protege enzimas previniendo el contacto directo con el medio ambiente, de tal modo se minimizan los efectos de burbujas de aire, agitación mecánica y

solventes hidrofóbicos, pero tiene limitaciones en cuanto a transferencia de masa y baja carga enzimática (Lalonde & Margolin, 2002).

### 2.3.1.3. Encapsulación

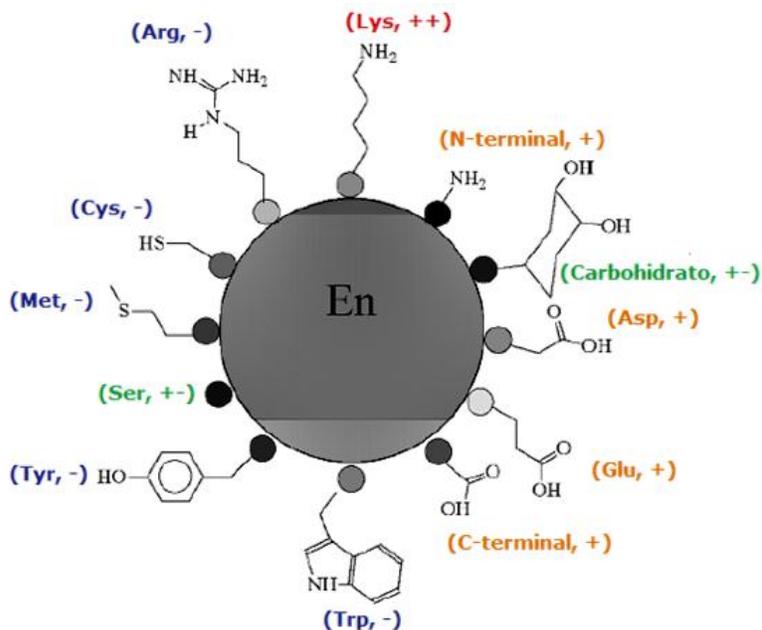
Este tipo de inmovilización por interacción física consiste en la formación de una membrana que ofrece una barrera física alrededor de la preparación enzimática (Fig. 21 C). Brinda protección al medio ambiente, sin embargo tiende a tener bajas transferencias de masa. Con este objetivo se han desarrollado cápsulas de alginatos (Lee *et al.*, 1993), carboximetil celulosa (Jiang *et al.*, 2008), entre otros. También se ha desarrollado una encapsulación empleando emulsiones en solución acuosa de feniletilenimina para encapsular la lacasa de *Trametes versicolor* (Kouisni & Rochefort, 2009).



**Figura 21.** Estrategias de inmovilización de enzimas, A) Adsorción, B) Atrapamiento, C) Encapsulación, D) Unión covalente a un soporte y E) Autoinmovilización ó entrecruzamiento. Las enzimas están representadas por círculos verdes (Brady & Jordaan, 2009).

### 2.3.1.4. Unión a soportes

La inmovilización de enzimas por unión a un soporte es un método en el cual la proteína queda unida al soporte mediante un enlace covalente ó por medio de interacciones físicas reversibles enzima-soporte (Fig. 21 D). Para lograr este objetivo, se emplean principalmente, pero no exclusivamente, los grupos amino reactivos de los aminoácidos de lisina típicamente presentes en la superficie de las proteínas (Fig. 22) y con los que se puede llevar a cabo el proceso de unión covalente de las enzimas a un grupo reactivo presente en el soporte, mediante un enlace covalente altamente estable. El grupo epóxido es comúnmente usado como grupo reactivo del soporte para llevar a cabo la unión con las lisinas de la enzima, ya que es reactivo en condiciones muy suaves (Mateo *et al.*, 2007a). Usualmente la unión covalente provee la unión más fuerte entre la enzima y el soporte en comparación con otros tipos de inmovilización, además de que logra minimizar la fuga de enzima del soporte (Cao, 2006b).



**Figura 22.** Grupos reactivos de los aminoácidos presentes en la superficie de las proteínas. Frecuencia de uso en inmovilización: rojo, muy frecuentemente; naranja, frecuentemente; verde, poco frecuente; azul, no empleados (Cao, 2006b).

Actualmente existen soportes comerciales como el Eupergit® activado con grupos epóxidos que es una esfera macroporosa, el Eupergit C (Mateo *et al.*, 2007a; Wang *et al.*, 2008), los Sepabeads® que son polímeros de resinas fibrosas activados con grupos funcionales epóxidos (Mateo *et al.*, 2007b) entre otros.

### 2.3.1.5. Autoinmovilización ó entrecruzamiento

La inmovilización libre de soporte o autoinmovilización es un método de interacción química que consiste en unir dos moléculas de enzima mediante compuestos de unión bifuncionales llamados agentes de entrecruzamiento sin el empleo de un soporte (Fig. 21 E). El agente más empleado para este propósito es el glutaraldehído, que es un dialdehído de pequeño tamaño. Algunas de las ventajas de este tipo de inmovilización son mayor actividad volumétrica, mayor actividad específica, mayor facilidad de producción, menor costo de producción, mayor pureza, menores interferencias y/o contaminaciones por el soporte y menores limitaciones de transferencia de masa (Brady & Jordaan, 2009; Cao *et al.*, 2003; Sheldon, 2007a).

### 2.3.2. Inmovilización libre de soporte

La inmovilización de enzimas libre de soporte no necesita de una masa extra inactiva, el soporte. Generalmente, consisten en la inmovilización por entrecruzamiento directo de enzimas disueltas (CLEs), enzimas cristalinas (CLECs), y enzimas agregadas (CLEAs) (Fig. 23) (Cao *et al.*, 2003).

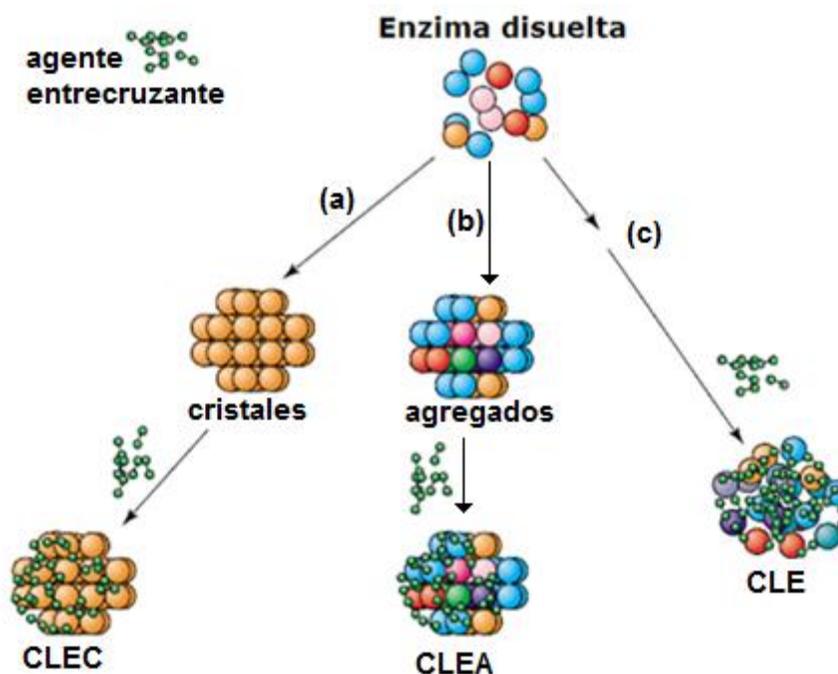


Figura 23. Tipos de inmovilización libre de soporte (Cao *et al.*, 2003).

El primer reporte de este tipo de estructuras fue descrito por (Quioco & Richards, 1966) quienes realizando estudios de química de proteínas en fase sólida encontraron que se podían obtener proteínas insolubles unidas entre sí mediante el empleo de un grupo químico de entrecruzamiento bifuncional, como el glutaraldehído, y que además retenían su actividad catalítica, lo que hoy en día se conoce como enzimas entrecruzadas (CLEs, del inglés “cross-linked dissolved enzymes”) (Fig. 23 c) ó partiendo de cristales de enzimas entrecruzados (CLECs del inglés “cross-linked enzyme crystals”) (Fig. 23 a) (Quioco & Richards, 1964). Sin embargo, en la época que salieron publicados estos trabajos, las investigaciones encaminadas a la inmovilización centraron sus mayores esfuerzos hacia la inmovilización por adsorción, atrapamiento y unión química a soportes, debido a la baja retención de actividad y estabilidad que presentaban los CLEs, por lo que este tipo de estructuras se empezaron a estudiar más intensivamente hasta los años de 1990 (Cao, 2006d; Sheldon, 2007b).

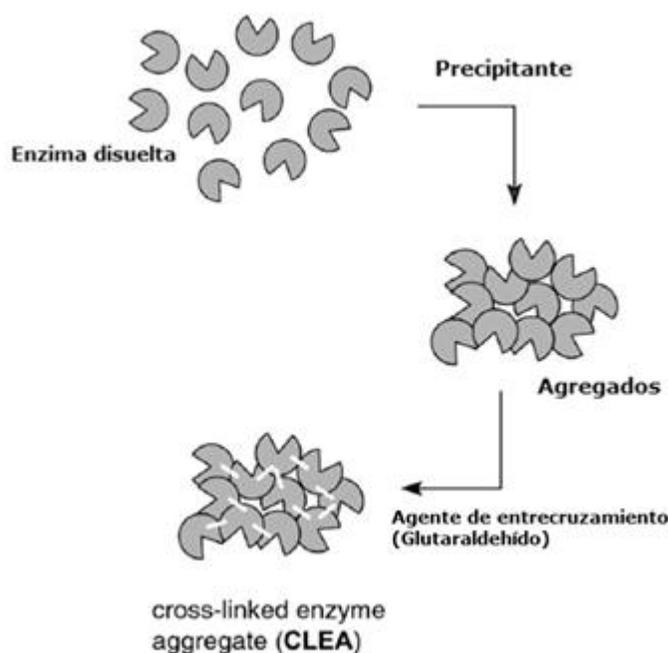
Los CLEs son proteínas en solución que se unen entre sí mediante un agente de entrecruzamiento y presentan tamaños de 1 a 100 $\mu$ m. En comparación con las enzimas nativas, éste tipo de biocatalizadores mejoran su termoestabilidad, sin embargo requiere del cuidado de varios factores como el pH, la cantidad de agente de entrecruzamiento, fuerza iónica y temperatura. Sin embargo presentan desventajas como su baja retención de la actividad nativa (usualmente menor al 50%), baja reproducibilidad, y baja estabilidad mecánica (Cao *et al.*,

2003). Estos inconvenientes se han tratado de mejorar haciendo atrapamiento de los CLEs en una matriz de gel o en membranas.

A la par de los estudios de producción de CLEs se realizaron estudios dirigidos hacia la obtención de CLECs (Fig. 23 a) que resultan ser muy adecuados para las biotransformaciones en medios no acuosos, debido a su gran estabilidad bajo condiciones hostiles (Quiocho & Richards, 1966; St. Clair & Navia, 1992). Este tipo de estructuras son proteínas cristalizadas y unidas entre sí con un agente de entrecruzamiento. Los CLECs presentan una gran estabilidad térmica y una buena resistencia mecánica, buena estabilidad a pH extremos, a solventes orgánicos y a proteólisis (Sheldon, 2007a). Se puede mejorar la actividad catalítica obtenida con los CLECs monitoreando el tamaño de los cristales de enzima. Se encontró que minimizando su tamaño se aumentaba la actividad catalítica retenida (Margolin, 1996). Sin embargo, su costo de producción es muy elevado ya que requieren de laboriosos protocolos de cristalización en los cuales se requiere una alta pureza de la enzima (Brady *et al.*, 2004; Talekar *et al.*, 2013). A pesar de su alto precio, a partir de los años 1990, algunas empresas como Vertex Pharmaceuticals (St. Clair & Navia, 1992) y Altus Biologics (Margolin, 1996) han producido y comercializado CLECs de hidrolasas como lipasas, proteasas y acilasas, para su aplicación como biocatalizadores para la síntesis asimétrica (Cao *et al.*, 2003).

En comparación con la cristalización, un método menos costoso para mejorar la proximidad de las moléculas de enzima y así poder realizar el entrecruzamiento de las mismas, es simplemente por precipitación de las proteínas mediante la adición de una sal, un solvente orgánico ó un polímero no iónico. Esta idea fue introducida por primera vez con la penicilin G acilasa en los laboratorios de Sheldon (Cao *et al.*, 2000) y posteriormente comercializada por CLEA Technologies (Holanda). Los CLEAs (del inglés “cross-linked enzyme aggregates”) se obtienen a partir de proteínas, no necesariamente purificadas, que se precipitan formando agregados que permanecen juntos por enlaces no covalentes, sin sufrir perturbación de su estructura terciaria y sin desnaturalización, que posteriormente se mantienen permanentemente insolubles por unión covalente mediante un agente de entrecruzamiento como el glutaraldehído (Fig. 23 b; Fig. 24) (Cao *et al.*, 2000; Sheldon, 2007b). Los CLECs y CLEAs exhiben de 10 a 1000 veces mayor actividad específica o másica (U/g) que sus correspondientes biocatalizadores unidos a un soporte, gracias a que carecen del mismo (Cao *et al.*, 2003; Tischer & Kasche, 1999). Consecuentemente, el uso de enzimas inmovilizadas libres de soporte, puede ser benéfico para los procesos en donde se requiere una alta productividad y altos rendimientos espacio-

tiempo ó para su uso con enzimas lábiles que no pueden ser eficientemente estabilizadas por métodos tradicionales de inmovilización sobre soporte. Además, el uso de enzimas inmovilizadas libres de soporte es claramente ventajoso ya que es posible alimentar reactores con mayor cantidad de enzima, lo que compensa la pérdida de actividad durante su reutilización, sin prolongar el tiempo de reacción. En contraste, las enzimas inmovilizadas sobre soportes ocupan más de un 10-20% del volumen del reactor, lo que provoca la prolongación del tiempo de reacción para poder lograr los mismos niveles de conversión (Cao *et al.*, 2003).



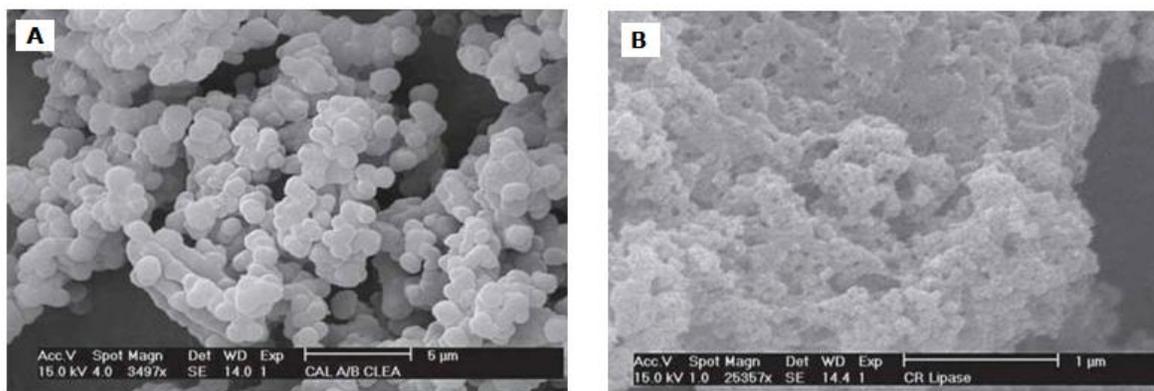
**Figura 24.** Procedimiento para la preparación de CLEAs (López-Serrano *et al.*, 2002).

Las enzimas inmovilizadas libres de soporte en forma de CLECs y CLEAs a menudo presentan selectividad similar a la que exhiben cuando están solubles en medio acuoso o liofilizadas en medios orgánicos. Los CLEAs tienen estabilidad y actividad similar a la de los CLECs. Además, mediante diferentes condiciones de cristalización o agregación (precipitación) se puede modular la conformación de los cristales y los agregados enzimáticos, hacia una forma más favorable que les permita incrementar sus propiedades catalíticas (Cao *et al.*, 2003). Debido a ello se ha encontrado que la enantioselectividad de estos biocatalizadores depende fuertemente de la conformación de los cristales ó de los agregados enzimáticos formados (Cao *et al.*, 2000).

Una propiedad importante de los CLEAs para su aplicación a gran escala es su tamaño de partícula, que tiene un efecto directo en las limitaciones de transferencia de masa y filtrabilidad.

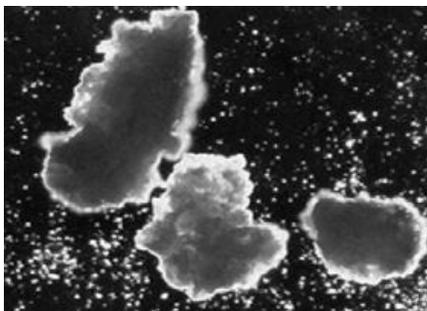
La cantidad de enzima y la concentración de glutraldehído son factores importantes que determinan el tamaño de partícula de los CLEAs como fue reportado para la CRL, cuya actividad óptima se observó con partículas de 40-50 nm (Yu *et al.*, 2006).

Estudiando la morfología de los CLEAs se han encontrado principalmente 2 clases de éstos: tipo 1) los que miden más de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y se forman a partir de enzimas poco glicosiladas con una gran superficie hidrofóbica como la CALB, que contienen  $8 \times 10^8$  moléculas de enzimas por CLEA y forman agregados de forma esférica (Fig. 25A); y tipo 2) los que miden menos de 0.1  $\mu\text{m}$  de diámetro, que se forman a partir de enzimas con superficies más hidrofílicas con más glicosilaciones como la CRL y la oxinitrilasa de *Prunus amygdalus* que presentan alrededor de  $8 \times 10^3$  moléculas de enzima por CLEA, y que son agregados de formas un poco más irregulares y más pequeñas que los tipo 1 (Fig. 25B) (Schoevaart *et al.*, 2004).



**Figura 25.** Morfología de los CLEAs. A) Tipo 1, CLEAs de la CALB, amplificación X3500; y B) Tipo 2, CLEAs de la CRL, amplificación X25000 (Schoevaart *et al.*, 2004).

Los CLEAs forman entre sí agregados de tamaño más grande, denominados “clusters” (Fig. 26), que a mayor longitud pueden presentar problemas de transferencia de masa. Los estudios futuros están encaminados a la formación de CLEAs que tengan menos tendencia a la formación de “clusters”.



**Figura 26.** Clusters de CLEAs de la CALB en agua, amplificación X150 (Schoevaart *et al.*, 2004).

Sin embargo, a pesar de que los CLEAs eliminan la necesidad de cristalización de la enzima de interés, sigue existiendo la desventaja inherente de que los protocolos exactos de agregación y entrecruzamiento deben establecerse nuevamente con cada enzima, implicando que se debe hacer un importante esfuerzo para optimizar sus condiciones de preparación (Roessl *et al.*, 2010).

A pesar de las grandes ventajas que representan las enzimas inmovilizadas libres de soporte, existen ciertos inconvenientes por solucionar tales como el aumento de su flexibilidad, así como también las metodologías exactas que permitan modular sus propiedades catalíticas variando las condiciones de precipitación y los agentes de entrecruzamiento (Cao *et al.*, 2003; Talekar *et al.*, 2013). Desafortunadamente, el diseño de enzimas inmovilizadas para su óptimo desempeño es aún en gran medida empírico (Sheldon, 2007b).

### **2.3.3. Factores que modifican la actividad, estabilidad y selectividad de los agregados enzimáticos entrecruzados**

Diversos estudios se han encaminado hacia la optimización de preparación de CLEAs, analizando los factores que modifican la actividad, estabilidad y selectividad de los mismos, como se observa en los ejemplos citados a continuación.

#### **2.3.3.1. Agentes precipitantes y condiciones de precipitación**

Los agentes precipitantes y las condiciones de precipitación juegan un papel crucial en la preparación de los CLEAs. Las condiciones de precipitación pueden inducir a una conformación más activa de la enzima (López-Serrano *et al.*, 2002). Sin embargo no se puede generalizar un mismo agente precipitante para todas las enzimas ya que cada una presenta mayor actividad con diferentes agentes precipitantes (Tabla 5) (Prabhavathi Devi *et al.*, 2009; Schoevaart *et al.*, 2004).

**Tabla 5.** Actividad relativa de los agregados enzimáticos antes del entrecruzamiento, empleando 90% (v/v) del precipitante (Schoevaart *et al.*, 2004).

Precipitante	CALA	CALB	TLL	RML	Lacasa	Tripsina	FDH <sup>a</sup>	Fitasa
Amortiguador	100	100	100	100	100	100	100	100
Metanol	3	64	43	21	0	89	2	19
Etanol	45	66	258	187	47	135	23	97
1-Propanol	48	30	1511	223	85	129	13	66
2-Propanol	43	77	169	95	99	144	55	93
<i>tert</i> -butanol	142	100	1779	934	139	148	90	88
Acetona	107	52	178	706	58	185	95	77
Acetonitrilo	100	75	561	428	27	151	84	79
DME <sup>1</sup>	231	100	1013	561	78	142	50	95
Lactato de etilo	86	39	108	14	108	142	32	123
Sulfato de amonio	101	131	113	133	139	186	88	52
DMF <sup>2</sup>	6	72	62	58	0	85	0	19
DMSO <sup>3</sup>	5	107	95	43	0	131	0	5
Polietilenglicol	115	138	141	102	186	153	81	80

<sup>a</sup>Formiato deshidrogenasa. <sup>1</sup>Dimetil etoxietano. <sup>2</sup>Dimetilformamida. <sup>3</sup>Dimetilsulfóxido.

En un estudio se demostró que durante la preparación de los CLEAs, el periodo de tiempo que pasa entre la precipitación de enzimas y el paso de entrecruzamiento influye en la organización estructural de la preparación enzimática resultante (Pchelintsev *et al.*, 2009). Así pues, este grupo de investigación evaluó la actividad de CLEAs de penicilinacilasa (PA) frescos (los que fueron entrecruzados inmediatamente después de la precipitación) y maduros (los que fueron entrecruzados después de pasar 7 días a 4°C), precipitando ambos con polietilenglicol (PEG-6000) haciendo el entrecruzamiento con glutaraldehído. Se observó que los CLEAs maduros presentan mayor tamaño que los frescos, además de que los estudios de cinética mostraron que los CLEAs maduros fueron más efectivos tanto en las reacciones de síntesis como de hidrólisis. Por lo que demostraron que el tamaño de los agregados puede regular el alcance de las modificaciones covalentes de la PA y por lo tanto influir en las propiedades catalíticas de sus respectivos CLEAs (Pchelintsev *et al.*, 2009).

Por otro lado, la adición de aditivos durante el paso de precipitación, como el Triton X-100, el dodecil sulfato de sodio y los éteres cíclicos (crown ethers), también influye mucho en la actividad de los CLEAs (Gupta *et al.*, 2009; López-Serrano *et al.*, 2002; Schoevaart *et al.*, 2004). El uso de detergentes como el Triton X-100 aumenta la actividad de aquellas lipasas que tienden a formar dímeros como la TLL, en cambio la CALB casi no se ve influenciada por presencia de Triton X-100 (Wilson *et al.*, 2006a).

La activación de las lipasas debida a los aditivos, como surfactantes y éteres cíclicos, se atribuye generalmente a que estas enzimas se ven inducidas a adoptar una conformación más activa (Theil, 2000). Los aditivos no están unidos covalentemente a la enzima, por lo que subsecuentemente pueden ser enjuagados del CLEA usando, por ejemplo, un solvente orgánico apropiado que deje a la enzima inmovilizada fija en una conformación catalítica favorable (Sheldon, 2007b). Así mismo, no sólo la actividad catalítica se ve afectada con el empleo de aditivos durante la preparación de los CLEAs. Wilson *et al.* (2006a) evaluaron la enantioselectividad de CLEAs de lipasas de *Alcaligenes* sp. en presencia de polietilenimina (PEI) y una mezcla PEI-dextrano sulfato (DP) como agentes precipitantes en presencia de Triton X-100. Ellos encontraron un aumento en el coeficiente enantiomérico *E* en la hidrólisis del butirato de glicidilo con aquellos CLEAs que fueron preparados en presencia del dicho detergente (Tabla 6).

**Tabla 6.** Actividad específica y enantioselectividad de CLEAs de la lipasa de *Alcaligenes* sp. en la hidrólisis del butirato de glicidilo (Wilson *et al.*, 2006a).

Biocatalizador	Actividad (U/gCLEA)		<i>E</i> ( <i>S</i> )
	<i>S</i> -isómero	<i>R</i> -isómero	
CLEA-PEI sin Triton	237	59	4.0 ± 0.2
CLEA-PEI con Triton	154	25	6.2 ± 0.3
CLEA-DP con Triton	496	35	14.2 ± 0.5

PEI, polietilenimina; DP, PEI-dextrano sulfato

Cuando una proteína es pobre en lisinas, la preparación de los CLEAs se vuelve un poco complicada, ya que los residuos de lisina están envueltos en el paso de entrecruzamiento cuando se emplea glutaraldehído o dextrano-polialdehído (Mateo *et al.*, 2004). Esta problemática puede resolverse precipitando a las proteínas con polímeros que contienen grupos amino primarios, como la polietilenimina (López-Gallego *et al.*, 2005a). Casos similares se presentan cuando la cantidad de proteína con la que se cuenta para la preparación del CLEA es muy pequeña. Para este tipo de inconveniente, se han empleado alimentadores proteicos como la albúmina sérica bovina (BSA), que sirven como fuente de proteínas para llevar a cabo el entrecruzamiento de la enzima de interés (Majumder *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2006). Se ha reportado que los CLEAs preparados en presencia de BSA retienen mayor actividad catalítica nativa que los que únicamente son preparados con enzima, como es el caso del CLEA de la PCL que retuvo un

100% de su actividad nativa, mientras que la misma enzima inmovilizada con glutaraldehído en ausencia de BSA tan sólo retuvo el 4% (Shah *et al.*, 2006).

### **2.3.3.2. Agentes y condiciones de entrecruzamiento**

El glutaraldehído es el agente de entrecruzamiento mayormente empleado ya que es de bajo costo y alta disponibilidad en el mercado. Sin embargo, con algunas enzimas, como las nitrilasas, la retención de actividad enzimática es muy baja o casi nula al emplear este dialdehído como agente de entrecruzamiento (Sheldon, 2007b). Mateo *et al.* (2004) probaron un polialdehído más voluminoso como agente de entrecruzamiento, que fue obtenido por oxidación del dextrano con peryodato, al cual llamaron dextrano-polialdehído. Los CLEAs formados con dicho agente de entrecruzamiento en comparación con los comúnmente formados con glutaraldehído tuvieron mucho mayor actividad (10-90 veces). Más aún, los CLEAs entrecruzados con glutaraldehído de las nitrilasas probadas, perdieron totalmente su actividad; efecto atribuido a que éste agente de pequeño tamaño logra entrar en el interior de la proteína y destruye su estructura terciaria, resultando en la completa pérdida de actividad; efecto que no se observó con el dextrano-polialdehído que es un polímero de cadena mayor.

Por otro lado, la concentración del agente de entrecruzamiento regula el grado de entrecruzamiento y por lo tanto modifica la estructura final de los CLEAs, resultado que impacta en su actividad y estabilidad. Evidencias de lo anterior, reportaron que un exceso del grado de entrecruzamiento reduce el rendimiento de enzima inmovilizada, productividad y estabilidad de los CLEAs de penicilin acilasa en la reacción de producción de cefalexina (Wilson *et al.*, 2009). Resultados más sorprendentes obtuvo el grupo de Gupta (Majumder *et al.*, 2008), quienes demostraron que una concentración específica del agente de entrecruzamiento puede aumentar la actividad, mientras que la misma cantidad puede disminuir la estabilidad y la enantioselectividad. Este grupo trabajó con CLEAs de la PCL a 3 concentraciones diferentes de glutaraldehído (10, 40 y 60 mM). Sus resultados muestran que el CLEA a 60 mM fue el más termoestable, efecto atribuido al mayor grado de entrecruzamiento; la enzima libre fue la que mejor tasa de transesterificación tuvo; y el CLEA a 10 mM fue el más enantioselectivo, debido a que su estructura era más rígida que la enzima nativa, y no tan rígida como los elaborados a 40 y 60 mM, ya que se ha reportado que la enantioselectividad se ve favorecida a menor grado de flexibilidad de la proteína (Bornscheuer, 2002a; Carrillo-Munoz *et al.*, 1996; Sheldon *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 1997). Así mismo, probaron que la morfología de los CLEAs es dependiente del grado de entrecruzamiento, que se aumenta al incrementar la concentración del mismo,

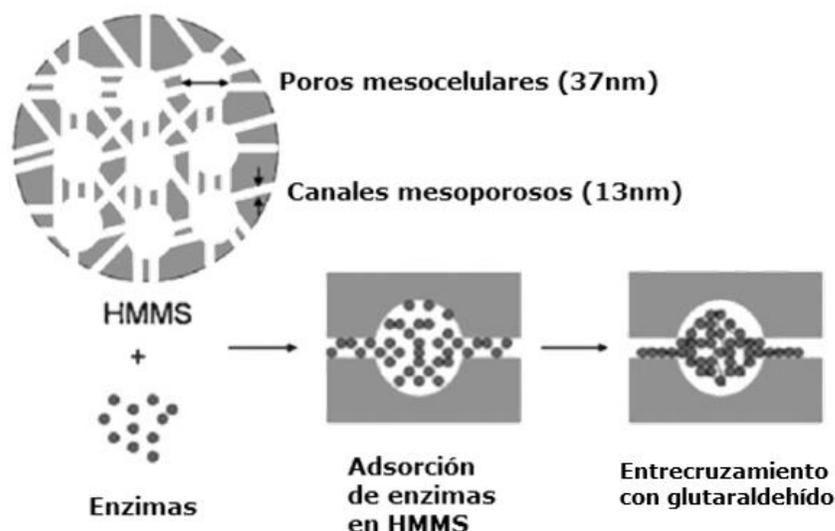
incrementando a su vez el grado de rigidez de la molécula, resultando en menor actividad catalítica (Majumder *et al.*, 2008).

El pH también juega un papel importante en el paso de entrecruzamiento. Cuando se utiliza glutaraldehído, éste puede estar en su forma monomérica o en su forma polimérica dependiendo de las condiciones de pH del medio; por lo tanto, los productos finales de reacción obtenidos en el paso de entrecruzamiento bajo condiciones alcalinas y ácidas son diferentes (Wine *et al.*, 2007) ya que el glutaraldehído tiende a polimerizar a valores altos de pH, lo que no ocurre a pH 7 (Wilson *et al.*, 2009).

### **2.3.3.3. Estabilidad mecánica**

Las enzimas inmovilizadas libres de soporte presentan dificultad para su escalamiento a nivel industrial ya que exhiben una baja estabilidad mecánica ante los esfuerzos cortantes y las condiciones severas de agitación. Los CLEAs son mecánicamente frágiles, difícilmente manipulables y recuperables después de usos repetitivos (Wilson *et al.*, 2004b).

Con el fin de mejorar la estabilidad mecánica de los CLEAs, varios grupos de investigación han trabajado en la encapsulación, recubrimiento y atrapamiento de éstos en polímeros y matrices que les permitan aumentar su estabilidad. Tal es el caso del grupo de Chang (Moon *et al.*, 2007) quienes prepararon CLEAs de quimiotripsina y de la lipasa de *Mucor javanicus* que fueron atrapadas dentro de los poros de una matriz de sílica mesocelular mesoporosa de poros jerárquicamente ordenados (HMMS). Este material tiene cavidades de 37 nm en donde quedan retenidos los CLEAs después de haber sido entrecruzados con glutaraldehído y no se pueden escapar ya que cada uno de estos pequeños huecos está unido por canales de 13 nm de diámetro por donde los CLEAs no pueden pasar y quedan retenidos en los poros (Fig. 27). Con este tipo de atrapamiento, se logró aumentar la estabilidad de los CLEAs hasta por 2 semanas en agitación a 200 rpm, gracias a que se evitó la lixiviación de los CLEAs del soporte y a la inhibición de la autólisis de la quimiotripsina gracias al entrecruzamiento.



**Figura 27.** Atrapamiento de CLEAs dentro de los poros mesocelulares del HMMS (Moon *et al.*, 2007).

Así mismo, se han encapsulado los CLEAs de penicilin acilasa dentro de un hidrogel de matriz polimérica rígida de polivinilalcohol (LentiKats®) los cuales resultaron muy estables en solventes orgánicos, además de mantener el 95% de su actividad por 50 días en agitación mecánica a 20°C (Wilson *et al.*, 2004b).

### 2.3.4. Inmovilización de enzimas sobre soportes

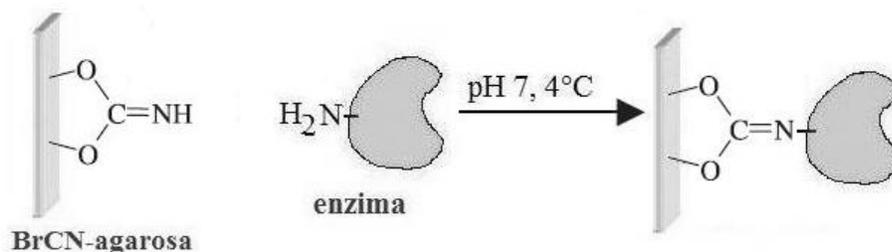
La inmovilización de enzimas sobre soportes porosos se puede llevar a cabo mediante la unión covalente de la enzima al soporte (irreversible) ó a través de la adsorción de la enzima mediante interacciones soporte-enzima (reversibles) tales como las iónicas y las hidrofóbicas (Mateo *et al.*, 2007b). La diversidad de soportes en cuanto a su naturaleza, tipo de unión enzima-soporte y geometría, permiten diseñar enzimas inmovilizadas bien ajustadas a una aplicación en específico (Cao, 2006d). Hoy en día existe una gran variedad de soportes disponibles para la inmovilización de enzimas, entre los cuales se encuentran aquellos inorgánicos como la sílica y las zeolitas (Cao, 2006a), otros polímeros orgánicos como la poliacrilamida y el polimetacrilato (Cao, 2006b), así como los biopolímeros de polisacáridos como la agarosa (Mateo *et al.*, 2005).

#### 2.3.4.1. Métodos irreversibles

Los métodos de inmovilización irreversible se basan en la formación de uno ó varios enlaces covalentes entre la enzima y el soporte. En comparación con otros métodos de inmovilización, los enlaces covalentes usualmente proveen la unión más fuerte enzima-soporte, lo que evita la liberación de la enzima en el medio de reacción (Cao, 2006b).

### 2.3.4.1.1. Inmovilización de enzimas sobre soportes de agarosa activada con grupos bromuro de cianógeno

El soporte de agarosa activado con grupos bromuro de cianógeno (BrCN-agarosa) permite la inmovilización de enzimas mediante la unión covalente unipuntual del amino terminal de la enzima con los grupos bromuro de cianógeno del soporte (Fig. 28). Este tipo de inmovilización se lleva a cabo a pH 7, por tiempos cortos y a bajas temperaturas (4°C). En estas condiciones de reacción, sólo reacciona el amino más reactivo (el amino terminal de la proteína), produciendo muy pocos cambios en la estructura de la enzima ya que ésta última se une al soporte únicamente mediante un punto (Kennedy *et al.*, 1983; Mateo *et al.*, 2005; Mateo *et al.*, 2006). Se ha reportado que las propiedades catalíticas de los derivados de enzimas inmovilizados en BrCN-agarosa son muy similares a las de la enzima libre (Bolívar, 2009; Godoy *et al.*, 2011; Rocha-Martin, 2012); sin embargo las interacciones enzima-enzima no son posibles, por lo tanto éste derivado sirve como referencia de la enzima libre para comparar los resultados obtenidos con otros tipos de inmovilización.

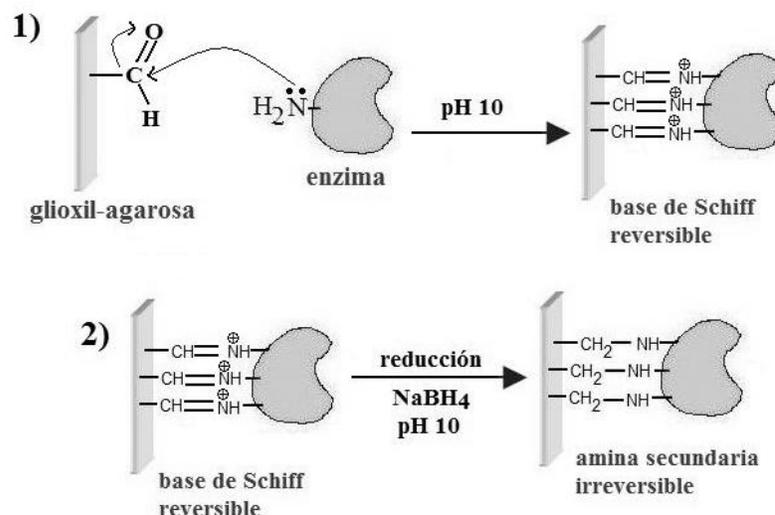


**Figura 28.** Inmovilización covalente unipuntual sobre soportes de agarosa activada con grupos bromuro de cianógeno (Kohn & Wilchek, 1982).

### 2.3.4.1.2. Inmovilización de enzimas sobre soportes de agarosa activada con grupos glioxil

Los soportes de agarosa activados con grupos glioxil (glioxil-agarosa) presentan la característica de tener grupos aldehído reactivos que en condiciones de pH alcalino forman enlaces covalentes con la zona de la enzima más rica en grupos amino no ionizado (Fig. 29). El tipo de unión enzima-soporte es muy intensa debido a la alta densidad de grupos aldehído reactivos en la superficie del soporte, que resulta en una unión multipuntual con la consecuente rigidificación de la estructura terciaria de la enzima (Guisán, 1988). Este tipo de inmovilización permite proveer de una gran estabilidad a las enzimas ya que la intensa unión formada evita los cambios estructurales que acontecen en condiciones distorsionantes como la temperatura, el pH, solventes, entre otras (Mateo *et al.*, 2007b; Mateo *et al.*, 2006). Además, el soporte glioxil-

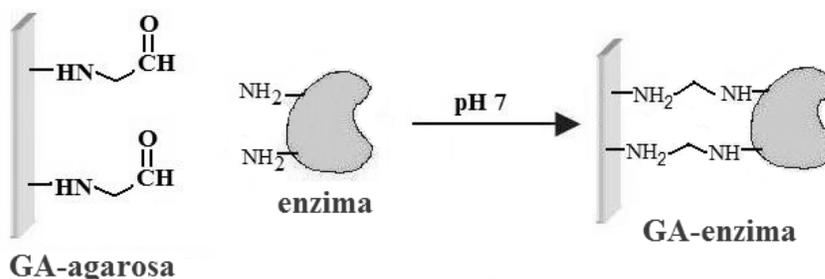
agarosa, provee un ambiente hidrofílico e inerte a la enzima inmovilizada. Sin embargo, las condiciones de inmovilización necesarias para preparar este tipo de derivados (pH = 10 y el empleo de borohidruro para la reducción de las bases de Schiff) muchas veces resultan poco favorables para la recuperación de la actividad de enzimas que no son estables en pH alcalino.



**Figura 29.** Inmovilización covalente multipuntual sobre soportes de agarosa activada con grupos glioxil (glioxil-agarosa). 1) Inmovilización de la enzima con formación de una base de Schiff reversible. 2) Reducción de la base de Schiff para la formación de un enlace amino secundario irreversible.

#### 2.3.4.1.3. Inmovilización de enzimas sobre soportes de agarosa activada con grupos monoamino-N-aminoetil y glutaraldehído

Esta clase de soporte se prepara a partir de agarosa activada con grupos monoamino-N-aminoetil (MANAE-agarosa) a la que se somete a una segunda activación con glutaraldehído (GA-agarosa), resultando en un soporte que presenta grupos amino y grupos aldehído en su superficie (López-Gallego *et al.*, 2013). Dependiendo de la concentración de glutaraldehído y del tiempo de reacción, este soporte puede quedar total o parcialmente activado con GA. El mecanismo de unión enzima-soporte, se explica en un primer paso de adsorción iónica de la enzima por su zona más rica en cargas negativas, seguido de la unión covalente entre alguno de los grupos amino de los residuos de lisina de la enzima con los grupos aldehído del GA (Fig. 30). Este tipo de inmovilización se ha empleado para la estabilización de diversas enzimas (Betancor *et al.*, 2006; López-Gallego *et al.*, 2005b) y a diferencia de la glioxil-agarosa, presenta la ventaja de que se puede lograr una unión multipuntual llevada a cabo a pH neutro en donde muchas enzimas son estables.



**Figura 30.** Inmovilización covalente multipuntual sobre soportes de agarosa activada con grupos monoamino-N-aminoetil y glutaraldehído (GA-agarosa).

#### 2.3.4.2. Métodos reversibles

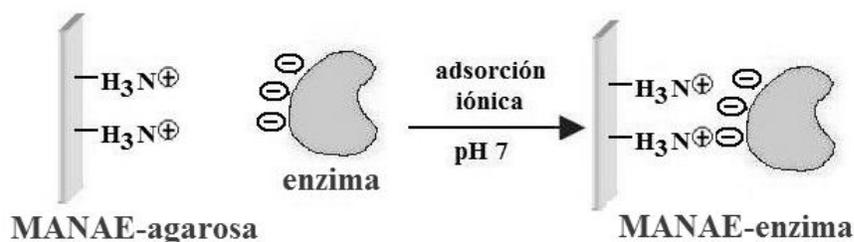
Los métodos reversibles de inmovilización de enzimas sobre soportes están basados en mantener la unión enzima-soporte mediante las interacciones que se puedan manifestar entre ellos (Tabla 7). Existen diversas interacciones reversibles por las que se pueden adsorber proteínas en soportes, tales como las electrostáticas, las hidrofóbicas, bioespecíficas, por afinidad y las no específicas como las fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofílicas (Cao, 2006a). Sin embargo, en comparación con los métodos irreversibles, la intensidad de la unión enzima-soporte es mucho menos fuerte; razón por la que este tipo de inmovilización se ha empleado más para la purificación de enzimas ya que su desorción es sencilla (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998; Fernandez-Lorente *et al.*, 2008; Volpato *et al.*, 2010) además de que permite la reutilización del soporte una vez que la enzima ha sido inactivada (Cao, 2006a).

**Tabla 7.** Ejemplo de soportes empleados para la inmovilización de enzimas vía adsorción reversible

Tipo de interacción	Soporte	Orientación de la enzima sobre el soporte	Referencia
Intercambio aniónico	MANAE-agarosa (monoamino-N-aminoetil)	Región con mayor carga neta negativa	(Fernandez-Lafuente <i>et al.</i> , 1993)
Intercambio catiónico	Carboximetil-sepharose®	Región con mayor carga neta positiva	(Fuentes <i>et al.</i> , 2004)
Hidrofóbica	Octil-agarosa	Región hidrofóbica	(Fernandez-Lafuente <i>et al.</i> , 1998)
	Octadecyl-Sephabeads®	Región hidrofóbica	(Cabrera <i>et al.</i> , 2009)
Por afinidad	Agarosa activada con IDA-Me <sup>2+</sup> (ácido iminodiacético-Cu <sup>2+</sup> y Ni <sup>2+</sup> )	Región con mayor cantidad de histidinas	(Armisen <i>et al.</i> , 1999)

### 2.3.4.2.1. Inmovilización de enzimas sobre soportes de agarosa activada con grupos monoamino-N-aminoetil

Los soportes de agarosa activados con grupos monoamino-N-aminoetil (MANAE-agarosa) tienen la característica de funcionar como intercambiadores iónicos (Fig. 31) debido a que en su superficie poseen una gran cantidad de grupos amino que se encuentran cargados positivamente a  $\text{pH} < 9$  y que tienen interacciones iónicas con los residuos de las proteínas cargados negativamente (principalmente residuos de los ácidos aspártico y glutámico) (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1993). Este soporte permite la inmovilización de enzimas en condiciones suaves ( $\text{pH}$  cercanos a 7, baja fuerza iónica y tiempos cortos de inmovilización); y se ha empleado exitosamente para la purificación (Pessela *et al.*, 2006) y estabilización de (Filho *et al.*, 2008) proteínas.

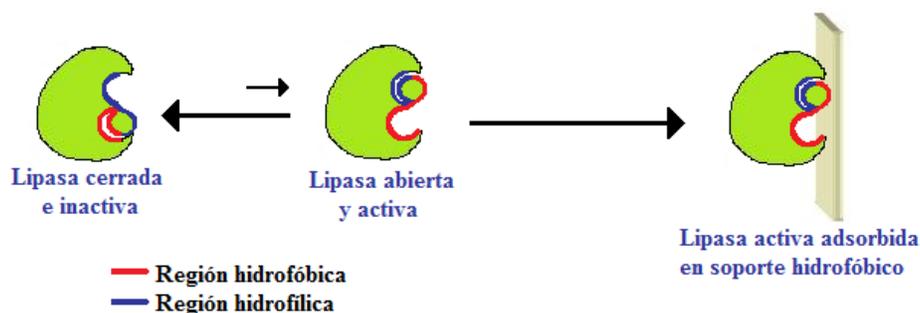


**Figura 31.** Inmovilización por adsorción iónica sobre soportes agarosa activada con grupos monoamino-N-aminoetil (MANAE-agarosa).

### 2.3.4.2.2. Inmovilización de enzimas sobre soportes de agarosa activada con grupos hidrofóbicos

Los soportes de agarosa activados con grupos hidrofóbicos se han empleado principalmente para la inmovilización y purificación de lipasas (Bastida *et al.*, 1998). Esto se debe a la gran superficie hidrofóbica que presentan estas enzimas en su sitio catalítico que les confiere una gran afinidad sobre superficies hidrofóbicas e interfases agua/aceite. Gracias a la similitud de este soporte con una interfase aceite/agua, en él se logra una adsorción de la lipasa en donde el sitio catalítico de la enzima queda orientado hacia la superficie del soporte en condiciones de baja fuerza iónica del medio (Fig. 32) (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998). La interacción hidrofóbica enzima-soporte provoca la apertura de la “tapa” que cubre el sitio catalítico de estas enzimas (fenómeno de activación interfacial) con la consecuente hiperactivación enzimática (Fernandez-Lorente *et al.*, 2008; Palomo *et al.*, 2002b). Para desorber las lipasas inmovilizadas de esta manera, basta con adicionar una alta concentración de

detergente, urea, guanidina y/o aumentar la fuerza iónica del medio para disminuir la interacción hidrofóbica enzima-soporte (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998).

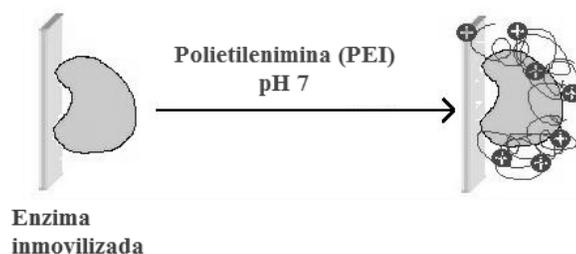


**Figura 32.** Inmovilización de lipasas sobre soportes activados con grupos hidrofóbicos.

#### 2.4. Modificación química y física de enzimas

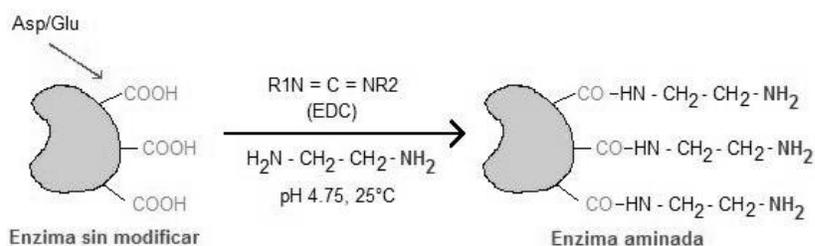
La modificación de la superficie de las proteínas consiste en la alteración de los sustituyentes R libres de los aminoácidos presentes en las proteínas. Las enzimas así modificadas pueden resultar en derivados con propiedades catalíticas diferentes, logrando que estas técnicas se hayan empleado tanto para la estabilización así como para la modificación de la selectividad enzimática (Fágáin, 1995; Palomo *et al.*, 2007a). Así mismo, se ha reportado su uso en combinación con técnicas de inmovilización, permitiendo lograr resultados mejorados (Rodriguez *et al.*, 2011).

Dentro de estas modificaciones, se encuentra el recubrimiento de la enzima con polietilenimina (PEI) que es un polímero iónico altamente cargado con cargas positivas. Esta técnica permite la formación de un ambiente hidrofílico alrededor de la enzima inmovilizada, ya que la PEI se mantiene unida a la proteína por medio de intercambio iónico entre las cargas positivas del polímero y las cargas negativas de la enzima (Fig. 33). Como consecuencia de la introducción de este ambiente altamente cargado con cargas positivas alrededor del sitio catalítico de una lipasa, la enzima puede sufrir alteración de la forma del sitio catalítico debido a la modificación de las interacciones electrostáticas de la proteína, lo que conlleva al cambio de sus propiedades catalíticas (Cabrera *et al.*, 2010). Además, esta técnica también se ha empleado para la estabilización de enzimas en solventes orgánicos (Guisan *et al.*, 2001).



**Figura 33.** Recubrimiento de enzimas con polímeros iónicos.

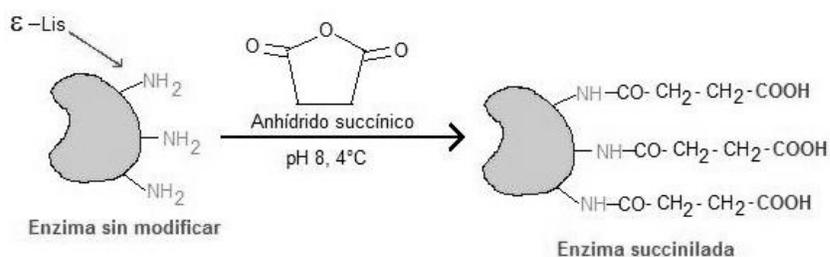
Dentro de las técnicas de modificación química trabajadas, se prepararon derivados inmovilizados aminados mediante la modificación química de los residuos carboxílicos de la enzima con etilendiamina (Fig. 34). Para ello, primero se lleva a cabo la activación de los grupos carboxilo de la enzima con la adición de 1-etil 3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), seguido de la formación de un enlace amida mediante la adición de etilendiamina. Tras la aminación, la superficie enzimática que originalmente presentaba cargas negativas (provenientes de los residuos de los aminoácidos de los ácidos aspártico y glutámico), es reemplazada por cargas positivas, modificando la carga neta de la enzima a pH neutro. Diferentes grados de aminación pueden lograr efectos distintos en la enzima, ya que se puede lograr la formación de nuevas interacciones iónicas cuando la aminación sólo se lleva a cabo parcialmente (Palomo *et al.*, 2007a).



**Figura 34.** Aminación de los residuos carboxílicos de la superficie de proteínas.

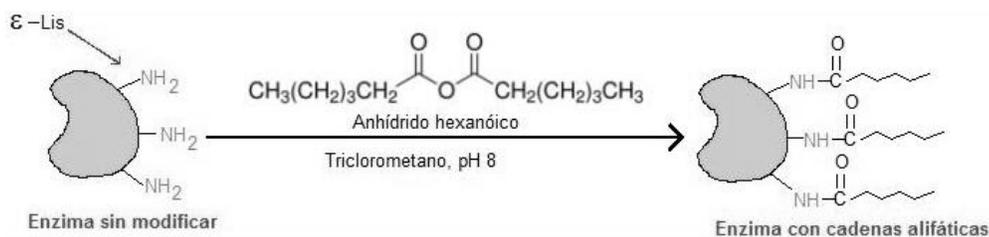
Otra de las modificaciones químicas llevada a cabo en el presente trabajo, fue la modificación de los grupos amino mediante la adición de anhídrido succínico (Fig. 35), proceso denominado succinilación. Con este tipo de modificación, la superficie enzimática se ve enriquecida con grupos carboxílicos, aumentando así el número de cargas negativas (El-Adawy, 2000). Del mismo modo que con la aminación, la succinilación puede ser parcial controlando la concentración de ácido succínico, sin embargo no se puede llevar a cabo la succinilación total ya que los grupos amino de los residuos de arginina no se pueden modificar con esta metodología. Este tipo de modificaciones se han usado para mejorar la estabilidad de enzimas (Bianchi *et al.*,

1993), así como para mejorar su adsorción en matrices de intercambio iónico (Montes *et al.*, 2006).



**Figura 35.** Succinilación de los grupos amino de la superficie de proteínas.

Finalmente, otro tipo de modificación química es el aumento de la hidrofobicidad de la superficie de una enzima mediante la adición de cadenas alifáticas. Dicho proceso puede lograrse mediante la reacción entre un anhídrido y los grupos amino de la proteína (Fig. 36). Este tipo de modificación se ha empleado para la mejora de la enantioselectividad de lipasas (Ueji *et al.*, 2003), para el aumento de la estabilidad de enzimas en sistemas agua-aceite (Vinogradov *et al.*, 2001), así como para la mejora de las propiedades emulsificantes y de espumado de algunas proteínas (Rade-Kukic *et al.*, 2011).



**Figura 36.** Adición de cadenas alifáticas a la superficie de proteínas.

Así mismo, se han acoplado las técnicas de inmovilización con las de modificación química logrando una mayor mejora de la actividad y selectividad enzimática (Fernández-Lorente *et al.*, 2012; López-Gallego *et al.*, 2012).

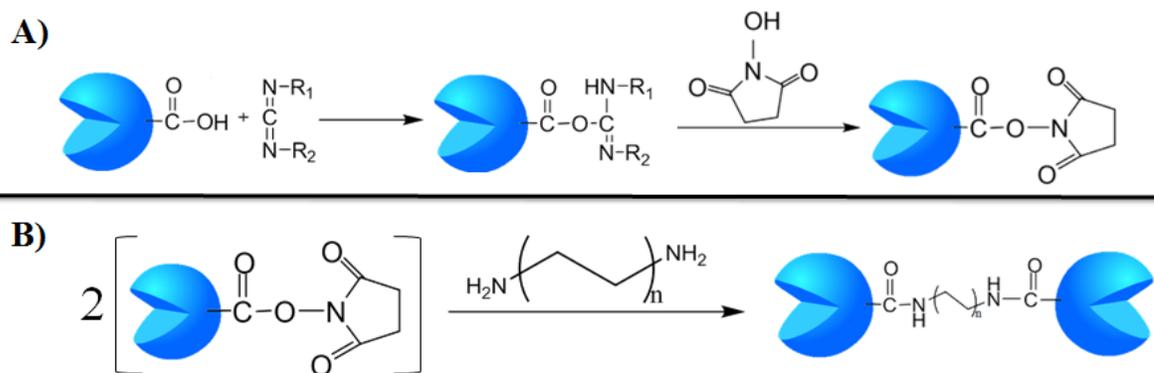
# 3. ANTECEDENTES

La inmovilización en forma de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) ha sido ampliamente aplicada para diversas enzimas como lipasas, proteasas, amidasas, lacasas, oxinitrilasas, penicilin acilasas, entre otras (López-Serrano *et al.*, 2002; Schoevaart *et al.*, 2004; Sheldon, 2011a; Talekar *et al.*, 2013). La tecnología de preparación de CLEAs ha mostrado ser una herramienta prometedora para la estabilización de proteínas proveyendo robustez a los biocatalizadores inmovilizados (Roessl *et al.*, 2010; Sheldon, 2011a). Entre ellas, la exitosa preparación de CLEAs de la lipasa de *Candida rugosa* mediante su entrecruzamiento con glutaraldehído actualmente se encuentra bien documentada (Kartal *et al.*, 2011; López-Serrano *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2006).

El glutaraldehído (GA) es el agente de entrecruzamiento mayormente empleado para la preparación de CLEAs, ya que logra un alto grado de entrecruzamiento, es de bajo costo y tiene alta disponibilidad en el mercado (Sheldon, 2011b). Sin embargo, el GA no puede ser universalmente empleado ya que en algunas enzimas, como las nitrilasas, la actividad enzimática es drásticamente reducida (Sheldon, 2007b). En respuesta a esto, varios reportes se han dedicado al estudio de otros agentes de entrecruzamiento como el dextrano-polialdehído (Mateo *et al.*, 2004), las *p*-benzoquinonas (Wang *et al.*, 2011a) y los epóxidos (Miletić & Loos, 2009). El mecanismo químico que llevan a cabo todos los anteriores resulta en la formación de un enlace covalente entre los grupos aldehído de los agentes de entrecruzamiento y los grupos amino libres de las lisinas de las enzimas (Wine *et al.*, 2007).

Así como los residuos de lisina, los grupos carboxilo libres (provenientes de los ácidos aspártico y glutámico) también son grupos reactivos presentes en la superficie de las proteínas. En general, en las proteínas, estos aminoácidos son más abundantes que los residuos de lisina (Klapper, 1977) incrementando el número de posibles sitios de entrecruzamiento.

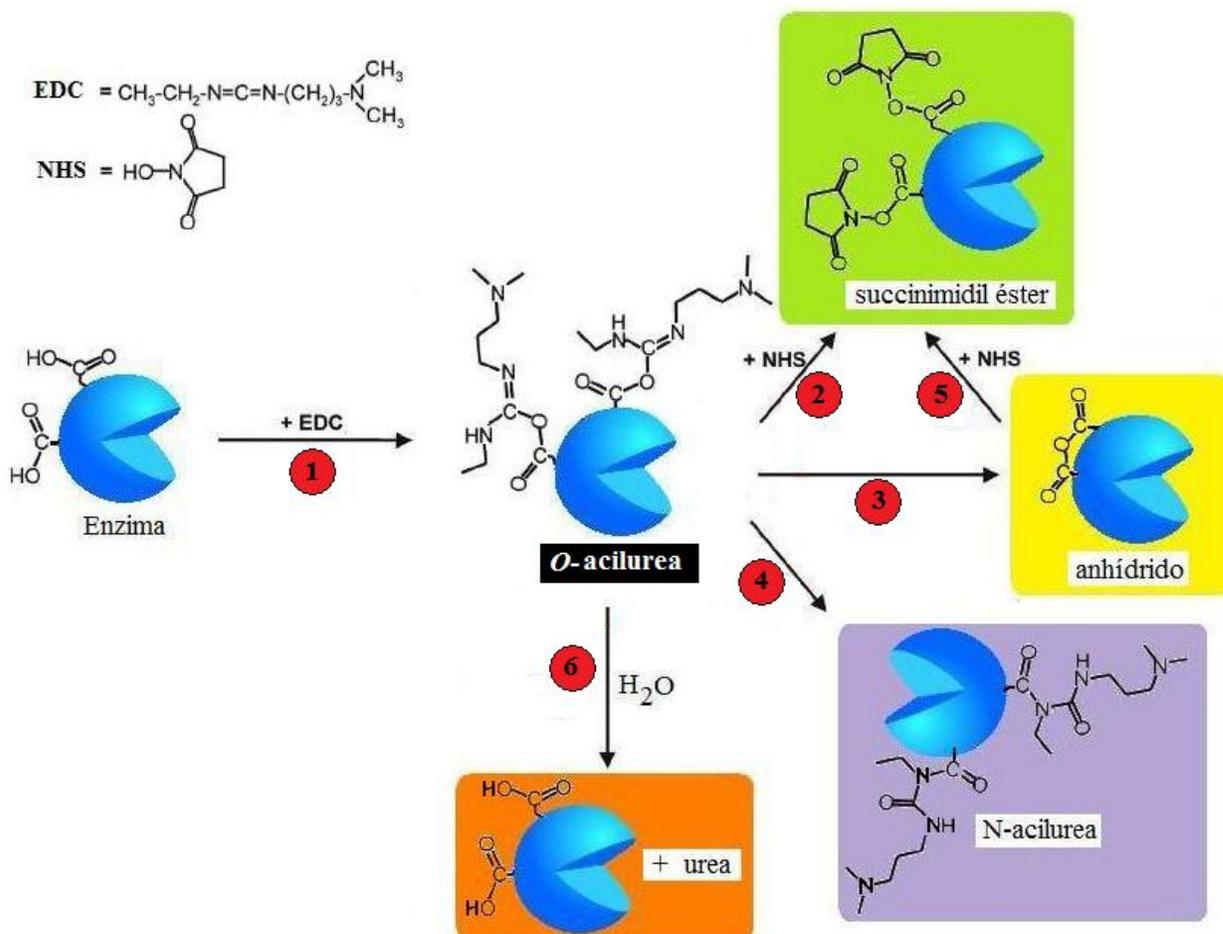
En la presente tesis se desarrolló una metodología de preparación de CLEAs empleando polímeros aminados como agentes de entrecruzamiento vía su unión covalente con los grupos carboxilo presentes en la enzima. Dicho proceso implica dos pasos: 1) la activación de los grupos carboxilo mediante la adición de EDC-NHS para volverse susceptibles de reaccionar con grupos amino y 2) la formación de enlaces amida entre los grupos amino de los polímeros adicionados y los grupos carboxilo previamente activados (Fig. 37).



**Figura 37.** Entrecruzamiento de enzimas a través de sus grupos carboxilo. A) Activación de los grupos carboxilo por adición de EDC-NHS. B) Formación del enlace amida entre el polímero aminado y la enzima.

El primer paso de la reacción que engloba la formación del enlace amida entre los grupos carboxilo y amino vía activación de los primeros con EDC ó EDC-NHS se encuentra descrita por varios autores (Grabarek & Gergely, 1990; Nakajima & Ikada, 1995; Sam *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011b). Estos reportes han estudiado los factores más importantes que rigen el mecanismo de formación del enlace amida a partir de los sustratos mencionados, así como los posibles subproductos formados en diferentes condiciones de reacción.

El primer paso, la activación de los grupos carboxilo, puede resultar en cuatro productos de reacción diferentes (Sam *et al.*, 2010) (Fig. 38): 1) La formación de una urea con la consecuente regeneración del carboxilo por hidrólisis del carboxilo activado, que se da cuando hay agua en el medio y cuando existen concentraciones altas de NHS y bajas de EDC, 2) La formación de una N-acilurea estable e indeseable, que se da cuando hay un gran exceso de EDC y NHS con respecto a los grupos carboxilo, 3) La formación de un anhídrido carbónico, que se da cuando existen ácidos carboxílicos libres, también cuando la concentración de EDC-NHS es muy inferior a la concentración de grupos carboxilo, así mismo cuando la concentración de EDC es muy superior a la de NHS (10 a 50 veces mayor); y 4) La formación de un succinimidil éster a partir de la *O*-acilurea que ocurre cuando la concentración de EDC y NHS son equimolares y no se encuentran en un gran exceso con respecto a los grupos carboxilo. En el marco de la presente tesis, de los 4 posibles productos de reacción mencionados, el succinimidil éster es el único deseado para llevar a cabo la metodología de inmovilización planteada (Fig. 37), ya que este producto es capaz de reaccionar con aminas (provenientes de la PEI) para formar el enlace amida y así llevar a cabo el entrecruzamiento propuesto.

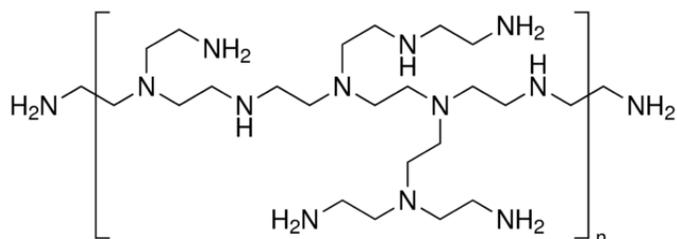


**Figura 38.** Posibles productos de reacción durante la activación de los grupos carboxilo de una proteína mediante la adición de EDC-NHS. 1) Formación de una *O*-acilurea, 2 y 5) Formación de un succinimidil éster, 3) Formación de un anhídrido, 4) Formación de una *N*-acilurea, y 6) Regeneración del grupo carboxilo por ruptura hidrolítica de la *O*-acilurea.

El mecanismo de activación de los grupos carboxilo con EDC ó EDC-NHS ha sido ampliamente empleado con diversos propósitos tales como la modificación intramolecular de proteínas (Perfetti *et al.*, 1976; Torchilin *et al.*, 1978), la formación de enlaces intermoleculares de proteínas para la mejora en la estabilidad de biomateriales empleados para implantes médicos (Olde Damink *et al.*, 1996; Slusarewicz *et al.*, 2010), la preparación de péptidos (Bartczak & Kanaras, 2011), para la inmovilización de proteínas en resinas poliacrílicas (Qu *et al.*, 2014), la aminación de los residuos carboxílicos de proteínas para su entrecruzamiento con glutaraldehído (Galvis *et al.*, 2012), entre otros. Sin embargo, nunca ha sido aplicado para la preparación de CLEAs con polímeros iónicos (polietileniminas) además de que la mayoría de los reportes existentes han sido realizados en un medio acuoso. El único trabajo que se asemeja al propuesto en la presente tesis, llevó a cabo la preparación de CLEAs de lacasas mediante el

entrecruzamiento de los grupos carboxilos activados de éstas enzimas con EDC-NHS para su entrecruzamiento con quitosano (Arsenault *et al.*, 2011).

Como fuente de grupos amino para el entrecruzamiento, nuestra propuesta fue introducir un polímero con numerosos grupos amino durante el proceso. Para ello se seleccionó a la polietilenimina (PEI) (Fig. 39) que es un polímero de etilenimina que se encuentra cargado positivamente por debajo de su  $pK_a = 9$  (Ford & Yang, 2007). La PEI ha sido empleada como agente de co-precipitación durante la preparación de CLEAs para mejorar el grado de entrecruzamiento con glutaraldehído (López-Gallego *et al.*, 2005a; Wilson *et al.*, 2006a). Además, se ha reportado que es capaz de brindar mayor estabilidad a las enzimas recubiertas con éste polímero debido a la formación de un microambiente cargado positivamente que evita el contacto de los solventes orgánicos con la enzima resultando en mayor estabilidad en presencia de los mismos (Cabrera *et al.*, 2010; Montes *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2011).



**Figura 39.** Estructura de la polietilenimina (PEI).

La PEI también es capaz de formar complejos polielectrolito-proteína unidos por interacciones iónicas entre las cargas positivas de este polímero y los aminoácidos de las proteínas cargados negativamente, lo que logra insolubilizar a las proteínas (Cooper *et al.*, 2005). Este tipo de complejos se han empleado con el fin de purificar enzimas ya que la interacción iónica que los mantiene unidos es relativamente estable pero puede revertirse en presencia de sales (Bassani *et al.*, 2011). Así mismo, también se ha empleado en la inmovilización de enzimas por adsorción a soportes de agarosa recubiertos de PEI, esta inmovilización desde luego también es reversible al adicionar NaCl (Mateo *et al.*, 2000b). Se ha reportado la adición de polímeros multiaminados a la reacción de entrecruzamiento de proteínas con EDC en medio acuoso, para el mejoramiento de biomatrices a base de colágeno que es entrecruzado con EDC en presencia de poli-L-lisina (Usha *et al.*, 2012). Así mismo se ha empleado a la PEI para el entrecruzamiento con EDC de la superóxido dismutasa (SOD1) en presencia de polietilenglicol en medio acuoso. Éste último trabajo centra sus esfuerzos en mejorar la estabilidad de la SOD1 en su aplicación

directa para el tratamiento de la enfermedad del Parkinson (Klyachko *et al.*, 2012). Sin embargo, en el trabajo anterior, el entrecruzamiento no se empleó como método de inmovilización para reutilizar la enzima, sino como estabilizador de la SOD1 en su aplicación directa.

Por otro lado, la reacción de activación de los grupos carboxilo con EDC se ve favorecida con solventes de bajas constantes dieléctricas (Pu *et al.*, 2009) además de que el intermediario carboxilo activado con EDC se vuelve más estable en este tipo de solventes (Nam *et al.*, 2008). Dicho efecto es favorable para la preparación de CLEAs vía activación de sus grupos carboxilo con EDC-NHS cuando el medio de reacción es un solvente orgánico.

Los CLEAs de diversas enzimas se han aplicado exitosamente en reacciones enantioselectivas (Chmura *et al.*, 2013; Gotor-Fernández *et al.*, 2012; Kartal & Kilinc, 2012; Sheldon *et al.*, 2013; Vaidya *et al.*, 2012). Sin embargo, existen muy pocos reportes sobre el efecto de las condiciones de preparación de los CLEAs de lipasas y la enantioselectividad que éstos presentan. Entre ellos, encontramos tres trabajos. El primero de estos reportó el efecto de la PEI y de la mezcla dextrano-PEI adicionados para la preparación de CLEAs de las lipasas CALB y la de *Alcaligenes* sp. entrecruzados con glutaraldehído en cuyos resultados reportan una mejora en la enantioselectividad de dichos CLEAs en comparación con la selectividad expresada por las mismas enzimas en su forma nativa (Wilson *et al.*, 2006a). Así mismo, se ha encontrado que los CLEAs de la CRL presentaron enantioselectividad independiente a su tamaño de partícula durante la resolución de ibuprofeno racémico (Yu *et al.*, 2006). En el tercero, se reportó el marcado efecto que ejerce la concentración del glutaraldehído en la enantioselectividad de los CLEAs de la PCL durante la transesterificación de citronelol racémico (Majumder *et al.*, 2008).

# 4. JUSTIFICACIÓN

Las lipasas son probablemente las enzimas más empleadas en la química orgánica ya que pueden reconocer un gran rango de sustratos diferentes y son ampliamente usadas como catalizadores regio-, acil-, quimio- y enantioselectivos en numerosas biotransformaciones (Andualema & Gessesse, 2012; Ferreira-Dias *et al.*, 2013; Hasan *et al.*, 2006). La enantioselectividad es una de las características más importantes de las lipasas que las convierte en biocatalizadores finos, ya que la preparación de enantiómeros puros de intermediarios quirales es un paso clave en muchos procesos industriales relevantes. Sin embargo, la especificidad enzimática hacia sustratos no naturales, no siempre es tan alta como es requerido en los procesos industriales (Palomo, 2009).

Además, a nivel industrial, las enzimas presentan varias desventajas ya que muchas veces no son suficientemente estables bajo las condiciones de reacción y en su forma libre no se pueden reutilizar. La inmovilización de enzimas ha surgido como una alternativa que disminuye la movilidad de las proteínas confiriéndoles mayor estabilidad en temperaturas extremas y condiciones adversas de reacción, además de permitirles su reutilización y adaptación en los procesos industriales (Adlercreutz, 2013; Guisán, 1988; Mateo *et al.*, 2007b).

Hoy en día existen muchos métodos de inmovilización, dentro de los cuales los que son libres de soportes están ganando cada vez mayor importancia ya que éstos ofrecen la ventaja de proveer de una alta producción volumétrica, un bajo costo de producción y también porque están compuestos sólo de proteína y pequeñas cantidades de agentes de entrecruzamiento (Mateo *et al.*, 2004; Sheldon & Van Pelt, 2013). La adición de enzimas inmovilizadas libres de soporte al catálogo de herramientas disponibles para biocatálisis, ofrece varias ventajas con respecto a las aplicaciones industriales tales como la simplicidad de preparación, que se traduce en bajos costos, corto tiempo de comercialización, flexibilidad y un amplio alcance (Cao *et al.*, 2003). Sin embargo, las estructuras enzimáticas inmovilizadas sin soporte pueden presentar bajos niveles de estabilidad mecánica bajo condiciones de agitación, sobre todo cuando los grupos reactivos de la enzima involucrados en el entrecruzamiento son escasos. Tal es el caso de las lipasas, las cuales presentan muy pocos residuos de lisina presentes en su superficie, lo que imposibilita su entrecruzamiento con glutaraldehído que es el agente mayormente empleado.

Como solución a esta problemática se propuso llevar a cabo la preparación de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) empleando grupos reactivos más abundantes en la superficie de las enzimas, como es el caso de los grupos carboxilo provenientes de los aminoácidos de los ácidos aspártico y glutámico. Para ello se llevó a cabo la construcción de biocatalizadores

inmovilizados en forma de CLEAs empleando como agentes de entrecruzamiento polímeros aminados que fungieran como brazo de unión mediante enlaces amida formados a partir de los grupos carboxilo libres de las enzimas. En nuestro conocimiento, es la primera vez que se llevó a cabo el tipo de entrecruzamiento propuesto en el presente proyecto para la preparación de CLEAs. Además, existen muy pocos estudios sobre el efecto del tamaño del agente de entrecruzamiento y su efecto en las propiedades morfológicas y catalíticas de los CLEAs.

# 5. OBJETIVOS

---

**General**

Diseño, obtención y caracterización de CLEAs de lipasas entrecruzados a través de sus grupos carboxilo con polímeros multiaminados, que presenten mejor enantioselectividad, estabilidad y actividad que sus contrapartes solubles y entrecruzadas con glutaraldehído.

**Particulares**

1. Estudiar la estabilidad de la CRL frente a diversas condiciones de pH, temperatura, detergentes y presencia de otros compuestos requeridos para el entrecruzamiento.
2. Seleccionar un agente y condiciones de precipitación de la CRL.
3. Establecer una metodología de preparación de CLEAs entrecruzados a través de sus grupos carboxilo con polímeros multiaminados para obtener biocatalizadores activos, estables y enantioselectivos para las reacciones modelo estudiadas.
4. Estudiar el efecto de las condiciones de preparación de los CLEAs de la CRL (CRL-CLEAs) sobre sus propiedades considerando como variables respuesta: actividad específica, actividad recuperada, tamaño, morfología, termoestabilidad y enantioselectividad en la resolución del (*S*)-ácido mandélico.
5. Obtener derivados inmovilizados de la CRL con diferente orientación y microambientes sobre soportes de agarosa.
6. Estudiar la estabilidad de los derivados de la CRL inmovilizados con y sin soportes bajo condiciones desestabilizantes.
7. Aumentar la enantioselectividad de las diferentes preparaciones inmovilizadas de la CRL mediante ingeniería del medio de reacción.
8. Determinar el efecto de las modificaciones químicas de la superficie de la CRL en la enantioselectividad de la enzima inmovilizada con diferentes orientaciones.
9. Estudiar el desempeño de las diferentes preparaciones inmovilizadas de la CRL en la hidrólisis del aceite de sardina para la producción de ácidos grasos omega-3.

## 6. HIPÓTESIS

El entrecruzamiento de lipasas a través de sus grupos carboxilo con polímeros aminados permitirá obtener CLEAs de lipasas más estables, activos y enantioselectivos que sus contrapartes entrecruzadas a través de sus grupos amino vía glutaraldehído.

La combinación de estrategias de inmovilización, modificación química e ingeniería del medio de reacción, permitirán la mejora de la enantioselectividad y estabilidad de la lipasa de estudio.

# 7. MATERIALES

## 7.1. Enzimas

En este trabajo se usaron lipasas de *Candida rugosa* (CRL) TVII en presentación polvo, *Candida antarctica* B (CALB) y *Thermomyces lanuginosus* (TLL) ambas en presentación líquida, todas de marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

## 7.2. Materiales

Los reactivos 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) fueron comprados en Pierce Scientific (Ciudad de México). Las polietileniminas (PEIs) con diferente peso molecular (Mw) 1,300 (PEI<sub>1.3</sub>), 25,000 (PEI<sub>25</sub>), 70,000 (PEI<sub>70</sub>) y 750,000 Da (PEI<sub>750</sub>), hexametildiamina (DH), albúmina sérica bovina (BSA), trioctanoína, *p*-nitrofenilbutirato (pNPB), *p*-nitrofeniloctanoato (pNPO), solución de glutaraldehído (25% en agua), monohidrato del ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES), ciclohexano, polietilenglicol (PEG) Mn 600, Triton X-100, peryodato de sodio, borohidruro de sodio, epiclorhidrina, tionaftaleno, glicidol, etanolamina, etilendiamina, glicerol, ácidos (*S*) y (*R*) mandélico, (*S*) y (*R*) 1-feniletanol, mezcla racémica del 2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo (HFBE), (*S*) y (*R*) 2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo, *rac*-1-feniletil acetato, ácido docosahexaenóico (DHA) y ácido eicosapentaenóico (EPA) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los solventes grado HPLC como acetonitrilo (ACN) y metanol fueron de marca J.T. Baker. El ácido 2-*O*-butiril-2-fenilacético (BFA) fue preparado siguiendo un protocolo previamente descrito (Palomo *et al.*, 2004). El soporte de agarosa activado con bromocianógeno (BrCN) fue comprado en GE Health Care (Uppsala, Suecia). Los soportes de agarosa BCL (beads cross-linked) 6BCL y octil 6BCL fueron comprados en ABT beads (Burgos, España). El aceite de sardina fue donado por la empresa BTSA Biotecnologías Aplicadas, S.L. (Madrid, España).

# 8. MÉTODOS

## 8.1. Métodos de determinación de la actividad lipasa por hidrólisis de ésteres de *p*-nitrofenol

Medición en celda (volumen del ensayo de 2.5 mL): La medición de actividad lipasa se llevó a cabo por el método espectrofotométrico basado en la hidrólisis de ésteres de *p*-nitrofenol (*p*NP). El sustrato *p*-nitrofenilbutirato (*p*NPB) se preparó a una concentración de 50 mM en acetonitrilo. Como mezcla de reacción, en una celda de 3 mL con un agitador magnético se colocaron 20  $\mu$ L de la solución de *p*NPB en 2 mL de amortiguador de fosfato de sodio 25 mM pH 7. Para iniciar la reacción, se adicionaron 50-100  $\mu$ L de solución enzimática o suspensión de CLEAs ó 50-100 mg de derivado inmovilizado en soporte. La actividad se determinó midiendo el incremento en la absorbancia a 348 nm a 25°C durante 5 min contra un blanco sin enzima en un espectrofotómetro UV-VIS marca Shimadzu® (modelo UV-mini-1240) equipado con un dispositivo de agitación magnética. Así mismo, se realizó una curva patrón de *p*-nitrofenol en las mismas condiciones. Se definió una unidad (U) como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de *p*-nitrofenol por minuto.

Medición en multipozos (volumen del ensayo de 150  $\mu$ L): como sustrato se empleó *p*-nitrofeniloctanoato (*p*NPO) 10 mM en 2-propanol. Se mezcló el sustrato 1:9 con amortiguador de fosfato de sodio 100 mM (pH 7). En este paso se incorporó 0.25% p/v de polivinil alcohol (PVA). Se colocaron 100  $\mu$ L de la mezcla en cada pozo (3 réplicas). La reacción se inició adicionando a cada pozo 50  $\mu$ L de extracto enzimático líquido o suspensión de CLEAs apropiadamente diluidos. Inmediatamente después se colocó la celda multipozos en el equipo lector de microplatos (ELx808™ BioTek®) y se midió la absorbancia a 405 nm a 30°C cada 20 s contra un blanco sin enzima durante 10 min agitando 5 s antes de cada lectura. Así mismo, se realizó una curva patrón de *p*NP en las mismas condiciones. Se definió una unidad (U) como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de *p*NP por minuto.

## 8.2. Análisis de proteína

### 8.2.1. Cuantificación de proteína

La determinación de proteína de las diferentes preparaciones enzimáticas solubles se determinó empleando el método de Bradford (Bradford, 1976) empleando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

### 8.2.2. Separación de proteínas por electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Para llevar a cabo la separación de proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética en condiciones desnaturizantes, se emplearon geles de poliacrilamida (9 x 6 cm) de 5% y 12% de polimerización en las zonas de concentración y separación, respectivamente (Laemmli, 1970). El tratamiento de las muestras se llevó a cabo haciendo una mezcla de 50  $\mu$ L de una suspensión de CLEAs ó solución de la CRL (30-40 mg/mL de proteína) con el mismo volumen de un amortiguador de ruptura (Tris-HCL 62.5 mM pH 6.8, 2% sodio-dodecil sulfato (SDS), 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, 5% glicerol, 120  $\mu$ g/mL de azul de bromofenol). A continuación, las muestras fueron hervidas durante 5 min. Terminado el tratamiento térmico se centrifugó 2 min a 8000 rpm. Posteriormente 15  $\mu$ L del sobrenadante fueron colocados en cada pozo del gel de poliacrilamida. La separación de las proteínas se llevó a cabo bajo un voltaje constante de 150 V a 25°C empleando un equipo Mini Protean 3 (BIORAD). Para la revelación de los geles se empleó azul brillante de Coomassie R-250.

### 8.3. Estabilidad de la lipasa de *Candida rugosa*

Durante la preparación y el desarrollo de las diversas metodologías de inmovilización de la CRL fue necesario establecer el efecto de los diferentes compuestos y condiciones de reacción a los que fue expuesta la enzima durante los procesos de inmovilización. Por este motivo se evaluó el efecto en la actividad de la CRL bajo las condiciones de reacción descritas a continuación.

#### 8.3.1. Efecto de la concentración EDC-NHS

En tubos Eppendorf de 2 mL se colocaron 5 mg de BSA más 10 mg de la CRL ambas en polvo. Luego, se adicionaron gota a gota y con agitación en vortex 200  $\mu$ L de EDC-HCl disuelto en ACN a diferentes concentraciones (soluciones reposadas 60 min antes de su aplicación). Pasados 5 min se agregaron gota a gota y con agitación en vortex 75  $\mu$ L de NHS disuelto en ACN (empleando una relación molar EDC/NHS = 1). Pasados 5 min se adicionaron gota a gota y con agitación en vortex 25  $\mu$ L de ACN y se dejaron reaccionar por 1 h a 25°C y 1000 rpm. Terminado el tiempo se adicionaron 1.5 mL de ACN y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min descartando el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 1.125 mL de hidroxilamina (empleando una concentración molar EDC/Hidroxilamina de 1:5) en amortiguador de fosfatos-NaCl pH 7 (0.1 M y 0.5 M, respectivamente) y se dejaron reaccionar por 1 h a 25°C y 1000 rpm. Posteriormente, se midió la actividad residual con pNPO.

### 8.3.2. Efecto de la concentración de PEI<sub>1,3</sub>

En tubos Eppendorf de 2 mL se colocaron 100  $\mu$ L de solución de la CRL (75 mg preparación comercial/mL amortiguador MES 0.1 M pH 5). Luego, se adicionaron gota a gota y con agitación en vortex 840  $\mu$ L de una mezcla de ACN/amortiguador MES 0.1 M pH 5 (65:35 v/v). Posteriormente, se adicionaron 30  $\mu$ L de una solución acuosa de PEI<sub>1,3</sub> a diferentes concentraciones. Se dejaron reaccionar por 1 h a 25°C y 1000 rpm. Terminado el tiempo se centrifugó a 12000 rpm por 5 min descartando el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 970  $\mu$ L de amortiguador de fosfatos-NaCl pH 7 (0.1 M y 0.5 M, respectivamente) y se midió la actividad residual con *p*NPO.

### 8.3.3. Efecto del Triton X-100 sobre la actividad de la CRL

A una solución de la CRL (1 mg de preparación comercial/mL de amortiguador de fosfatos 25 mM pH 7) se le determinó su actividad como en 8.1. en celda de 3 mL a diferentes concentraciones de Triton X-100. Para cada concentración de Triton X-100 probada, el amortiguador de la mezcla de reacción ya contenía una concentración determinada del detergente (0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 1% p/v).

### 8.3.4. Estabilización de la CRL en presencia de polioles a pH 10

Polioles empleados: Solución de PEG 600 al 30% v/v en amortiguador bicarbonato de sodio 100 mM pH 10, al finalizar se ajustó el pH a 10. Solución de glicerol: 15 mL glicerol 85% más 35 mL de amortiguador de bicarbonato de sodio 100 mM pH 10, no hubo necesidad de ajustar el pH. Solución de dextrano: 5 g de dextrano de *Leuconostoc* más 50 mL de amortiguador de bicarbonato de sodio 100 mM pH 10, no hubo necesidad de ajustar el pH.

En frascos de plástico de 20 mL se colocaron 1.1 mg de preparación comercial de la CRL a los que se adicionaron 15 mL de solución acuosa del poliol a 4°C. Inmediatamente se midió la actividad inicial con *p*NPB. Se mantuvieron a 4°C durante diferentes tiempos de incubación (1 min, 5 min, 1 h, 2 h, 4 h y 26 h). Se determinó la actividad residual con *p*NPB para cada tiempo.

### 8.3.5. Estabilización de la CRL en presencia de PEG a pH 10

En frascos de plástico de 20 mL se colocaron 1.1 mg de preparación comercial de la CRL a los que se adicionaron 15 mL de solución acuosa de PEG enfriada a 4°C a diferentes concentraciones (10, 20, 30, 40 y 50% v/v). Inmediatamente se midió actividad inicial con *p*NPB. Se mantuvieron a 4°C durante diferentes tiempos de incubación (1 min, 5 min, 1 h, 2 h, 4 h y 26 h). Se determinó la actividad residual con *p*NPB para cada tiempo. La solución madre de

PEG se preparó mezclando 15 mL de PEG 600 con 35 mL de amortiguador de bicarbonato de sodio 100 mM pH 10, a la que se ajustó el pH a 10.

#### **8.4. Agentes y condiciones de precipitación de la CRL**

Para la precipitación de la CRL se empleó una metodología basada en los reportes de López-Serrano *et al.* (2002) y Schoevaart *et al.* (2004). En un tubo Eppendorf de 2 mL se añadieron 100  $\mu$ L de una solución de enzima (75 mg preparación comercial/mL de amortiguador de fosfato de sodio 100 mM pH 7) a los que se adicionaron 900  $\mu$ L de agente precipitante en la dilución adecuada (*tert*-butanol, acetonitrilo ó solución saturada de sulfato de amonio en el mismo amortiguador). Se mantuvo en constante agitación a 1200 rpm durante 30 min a 4°C. Después se centrifugó a 10000 rpm por 5 min. Se midió actividad con *p*NPO al sobrenadante y al precipitado resuspendido en el mismo amortiguador.

#### **8.5. Estudio y desarrollo de la metodología de entrecruzamiento de la CRL con polietileniminas**

##### **8.5.1. Efecto del tiempo de incubación de la solución de EDC-HCl**

Se preparó una solución de EDC-HCl en acetonitrilo (120 y 120 mM respectivamente) que fue agregada inmediatamente a un tubo Eppendorf de 2 mL que contenía 10 mg de BSA en polvo (tiempo de reposo 0 min). Se dejó reaccionando por 30 min a 25°C y 8 rpm. Pasado el tiempo de reacción se agregaron 1.125 mL de amortiguador MES-NaCl pH 6 (0.1 M y 0.5 M, respectivamente) y se agitó 30 s en vortex. Se centrifugó a 10000 rpm por 5 min. Finalmente, se midió la proteína del sobrenadante con la metodología descrita en 8.2.1. Se repitió la misma metodología para los tiempos de reposo (5, 10, 20, 40, 60 y 80 min).

##### **8.5.2. Efecto de la concentración de agua durante el entrecruzamiento de BSA en un sistema acetonitrilo/agua**

En tubos Eppendorf de 2 mL se pesaron 10 mg de BSA en polvo. Después se adicionaron 60  $\mu$ L de mezcla de amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7 con ACN (10, 20, 30, 40, 50 ó 60  $\mu$ L de amortiguador más 50, 40, 30, 20, 10 ó 0.0  $\mu$ L de ACN respectivamente) y se agitó hasta tratar de homogeneizar todo. Posteriormente, se agregaron gota a gota 30  $\mu$ L de PEI<sub>1.3</sub> (3.2 g/mL concentración final) en ACN. Pasados 45 min después de agregar la PEI<sub>1.3</sub>, se adicionaron, gota a gota, 30  $\mu$ L de EDC-HCl (124 mM en ACN concentración final, reposado 60 min antes de su aplicación). Pasados 5 min se adicionaron rápidamente 10  $\mu$ L de NHS (124 mM en ACN

concentración final). Se dejaron reaccionar a 25°C y 8 rpm durante 30 min. Pasado el tiempo se centrifugó a 10000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 1.125 mL de amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7. Posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm por 5 min y se midió proteína al sobrenadante como en 8.2.1.

### **8.5.3. Efecto de la concentración de PEI en el entrecruzamiento de BSA en medio acuoso y en acetonitrilo/agua (80:20 v/v)**

En tubos Eppendorf de 2 mL se colocaron 10 mg de BSA en polvo. Se adicionaron 200 µL de amortiguador de fosfatos-NaCl pH 7 (0.1 M y 0.5 M, respectivamente) y después se agitó en vortex hasta tratar de disolver toda la BSA. Luego, se adicionaron 1.8 mL de ACN para precipitar la BSA. Después, se centrifugó a 10000 rpm por 5 min descartando el sobrenadante. Posteriormente, se adicionaron 50 µL de PEI<sub>1,3</sub> (en agua ó en una mezcla 65:35 ACN/agua). Se dejaron reposar sin agitación durante 45 min. Pasado el tiempo se adicionaron 50 µL de EDC-HCl 1.6 M en ACN (reposado 60 min antes de su aplicación) ó en agua (sin reposo). Pasados 5 min se adicionaron 20 µL de NHS 2 M en ACN ó en agua. Se dejaron reaccionar por 30 min a 8 rpm y 25°C. Terminado el tiempo de reacción se resuspendió adicionando amortiguador de fosfatos-NaCl pH 7 para llevarlo a un volumen final de 1.125 mL. Posteriormente, se centrifugó por 5 min a 10000 rpm. Finalmente, se midió proteína al sobrenadante como en 8.2.1.

### **8.5.4. Diseño factorial para la evaluación del efecto de la concentración de EDC y PEI en la efectividad de entrecruzamiento y el tamaño de los agregados proteínicos entrecruzados de BSA**

En tubos Eppendorf de 2 mL con 10 mg de BSA en polvo se adicionaron gota a gota con agitación en vortex 50 µL de PEI<sub>1,3</sub> 192, 127 y 64 g/L (disueltos en una mezcla 65:35 ACN/agua) y se dejaron reposar 45 min. Después, se adicionaron gota a gota 50 µL de EDC-HCl 900, 600 ó 300 mM en ACN (reposado 60 min antes de su aplicación). Pasados 5 min después de adicionar el EDC-HCl se agregaron de inmediato 20 µL de NHS 1125, 750 ó 375 mM en ACN. Se dejaron reaccionar a 25°C durante 30 min a 8 rpm. Pasado el tiempo se adicionaron 900 µL de ACN y se centrifugó a 10000 rpm por 5 min, desechando el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 1.125 mL de amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7. Se agitó 30 s en vortex y se volvió a centrifugar a 10000 rpm por 5 min. Se midió proteína al sobrenadante como en 8.2.1.

### **8.5.5. Efecto de la concentración de PEI<sub>1,3</sub> en el entrecruzamiento de los CRL-CLEAs en acetonitrilo**

En tubos Eppendorf de 2 mL se colocaron 1 mg de BSA más 10 mg de la CRL ambas en polvo. Luego, se adicionaron gota a gota y con agitación en vortex 200 µL de EDC-HCl (5 mM en ACN concentración final reposado 60 min antes de su aplicación). Pasados 5 min se agregaron gota a gota y con agitación en vortex 75 µL de NHS (5 mM en ACN concentración final). Pasados 5 min se adicionaron gota a gota y con agitación en vortex 25 µL de PEI<sub>1,3</sub> en agua destilada y se dejaron reaccionar por 30 min a 25°C y 1000 rpm. Terminado el tiempo se adicionaron 1.5 mL de ACN y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min descartando el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 1.125 mL de hidroxilamina en amortiguador MES-NaCl pH 5 (0.1 M y 0.5 M, respectivamente) y se dejaron reaccionando por 30 min a 25°C y 1000 rpm. Pasado el tiempo se centrifugó a 12000 rpm por 5 min y se midió actividad al sobrenadante y al precipitado lavado 3 veces con 1 mL de amortiguador MES-NaCl pH 5, el cual fue resuspendido finalmente en 1.125 mL de amortiguador fosfatos 100 mM pH 7.

### **8.5.6. Efecto de la concentración de EDC-NHS en el entrecruzamiento de los CRL-CLEAs con PEI<sub>1,3</sub> en acetonitrilo**

En tubos Eppendorf de 2 mL se colocaron 1 mg de BSA más 10 mg de la CRL ambas en polvo. Luego, se adicionaron gota a gota y con agitación en vortex 200 µL de EDC-HCl (46, 23, 12 y 8 mM en ACN) reposado 60 min antes de su aplicación. Pasados 5 min se agregaron gota a gota y con agitación en vortex 75 µL de NHS (125, 62, 31 y 22 mM en ACN). Después de 5 min se adicionaron gota a gota y con agitación en vortex 25 µL de PEI<sub>1,3</sub> en agua destilada para una concentración final de 3 g/L y se dejaron reaccionar por 30 min a 25°C y 1000 rpm. Terminado el tiempo se adicionaron 1.5 mL de ACN y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min descartando el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 1.125 mL de hidroxilamina (42, 21, 10 y 7 mM) en amortiguador MES-NaCl pH 5.0 (0.1 y 0.5 M respectivamente) y se dejaron reaccionando por 30 min a 25°C y 1000 rpm. Pasado el tiempo se centrifugó a 12000 rpm por 5 min y se midió actividad al sobrenadante y al precipitado lavado 3 veces con 1 mL de amortiguador MES-NaCl pH 5, el cual fue resuspendido finalmente en 1.125 mL de amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.

---

**8.5.7. Efecto de la concentración de BSA en el entrecruzamiento de los CRL-CLEAs con PEI<sub>1,3</sub> en acetonitrilo**

En tubos Eppendorf de 2 mL se colocaron 10 mg de la CRL más BSA ambas en polvo (1, 3 y 5 mg). Después, se adicionaron 100  $\mu$ L de ACN. Posteriormente, se adicionaron gota a gota y con agitación en vortex 100  $\mu$ L de EDC-HCl (78 mM en ACN reposado 60 min antes de su aplicación). Pasados 5 min se agregaron gota a gota y con agitación en vortex 75  $\mu$ L de NHS 104 mM en ACN. Pasados 5 min se adicionaron gota a gota y con agitación en vortex 25  $\mu$ L de PEI<sub>1,3</sub> (a una concentración final de 3.5 g/L en agua destilada) y se dejaron reaccionar por 30 min a 25°C y con una agitación de 1000 rpm. Terminado el tiempo se adicionaron 1.5 mL de ACN y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min descartando el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 1.125 mL de hidroxilamina (37.4 mM) en amortiguador MES-NaCl pH 5.0 (0.1 y 0.5 M respectivamente) y se dejaron reaccionando por 30 min a 25°C y 1000 rpm. Pasado el tiempo se centrifugó a 12000 rpm por 5 min y se midió actividad al sobrenadante y al precipitado lavado 3 veces con 1 mL de amortiguador MES-NaCl pH 5, el cual fue resuspendido finalmente en 1.125 mL de amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.

**8.5.8. Efecto de la concentración de trioctanoína en el entrecruzamiento de los CRL-CLEAs con PEI<sub>1,3</sub> en acetonitrilo**

En tubos Eppendorf de 2 mL se colocaron 1 mg de BSA más 10 mg de la CRL ambas en polvo. Después se adicionaron 100  $\mu$ L de trioctanoína en ACN y se dejaron reposando 60 min a 4°C. Posteriormente, se adicionaron gota a gota y con agitación en vortex 100  $\mu$ L de EDC-HCl 78 mM en ACN (reposado 60 min antes de su aplicación). Pasados 5 min se agregaron gota a gota y con agitación en vortex 75  $\mu$ L de NHS 104 mM en ACN. Pasados 5 min se adicionaron gota a gota y con agitación en vortex 25  $\mu$ L de PEI<sub>1,3</sub> en agua destilada (a una concentración final de 3.5 g/L) y se dejaron reaccionar por 30 min a 25°C y 1000 rpm. Terminado el tiempo, se adicionaron 1.5 mL de ACN y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min descartando el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 1.125 mL de hidroxilamina (37.4 mM) en amortiguador MES-NaCl pH 5.0 (0.1 y 0.5 M respectivamente) y se dejaron reaccionando por 30 min a 25°C y 1000 rpm. Pasado el tiempo se centrifugó a 12000 rpm por 5 min y se midió actividad al sobrenadante y al precipitado lavado 3 veces con 1 mL de amortiguador MES-NaCl pH 5, el cual fue resuspendido finalmente en 1.125 mL de amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.

### **8.5.9. Efecto de la concentración de EDC-NHS en el entrecruzamiento de los CRL-CLEAs con PEI<sub>1,3</sub> en medio acuoso empleando como agente precipitante 64% p/v de sulfato de amonio**

Preparación de la solución de enzima: en tubos Falcon de 15 mL se colocaron 300 mg de la CRL más 6 mg de BSA y se adicionaron 6 mL de amortiguador MES 100 mM pH 5 (50 mg CRL /mL). Se centrifugó a 3750 rpm por 5 min. Se traspasó a tubos Eppendorf de 2 mL para centrifugar a 14000 rpm por 5 min y descartar el precipitado.

Se colocaron 500  $\mu$ L de solución de enzima en tubos Eppendorf de 2 mL. Se adicionaron 300 mg de sulfato de amonio sólido y se agitaron hasta disolver el sulfato de amonio. Después se adicionaron 500  $\mu$ L de solución de sulfato de amonio (60% en amortiguador MES 100 mM pH 5). Luego, se agregaron 50  $\mu$ L de EDC en amortiguador MES 100 mM pH 5 y se agitó. Pasados 5 min, se adicionaron 50  $\mu$ L de NHS 1 M en amortiguador MES 100 mM pH 5 y agitó. Posteriormente, pasados 5 min se adicionaron 50  $\mu$ L PEI<sub>1,3</sub> (2 g/L en agua). Se dejó reaccionando 30 min a 25°C con agitación a 1000 rpm. Pasado el tiempo, se centrifugó a 10000 rpm por 5 min. Se revisó que no se hubieran formado dos fases líquidas inmiscibles. Se midió la actividad al sobrenadante y descartó el restante del sobrenadante. Después se resuspendió el precipitado en 1 mL de amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7. A continuación se centrifugó a 10000 rpm por 5 min y se midió la actividad al sobrenadante que también fue desechado. El precipitado fue resuspendido en amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7 y se lavó 3 veces más (con 1 mL de amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7). Finalmente, se midió actividad al precipitado.

### **8.5.10. Preparación de CLEAs de las lipasas CALB y TLL entrecruzadas con PEI<sub>1,3</sub> en acetonitrilo**

A tubos Eppendorf de 2 mL que contenían el precipitado de 360  $\mu$ L de preparación comercial de la CALB o la TLL (precipitado con ACN) se agregaron 20  $\mu$ L de PEI<sub>1,3</sub> (a una concentración final de 520 mg/L) en ACN/amortiguador de fosfatos (para preparar esta solución se incorporó amortiguador de fosfatos al ACN para que en el volumen de reacción hubiera 20% de amortiguador). Se dejaron en reposo por 45 min y se adicionaron 20  $\mu$ L de EDC-HCl (a una concentración final de 448 mM en ACN reposado 60 min antes de su aplicación). Pasados 5 min se adicionaron 10  $\mu$ L de NHS (a una concentración final de 448 mM en ACN). Se dejaron reaccionar a 25°C por 30 min bajo agitación a 1000 rpm. Pasado el tiempo, se adicionaron 800  $\mu$ L de ACN y se centrifugó a 10000 rpm por 5 min descartando el sobrenadante. El precipitado

se resuspendió en 1.125 mL de hidroxilamina (a una relación molar 5 veces mayor a la de EDC) en amortiguador MES-NaCl pH 5.0 (0.1 y 0.5 M respectivamente) y se dejaron reaccionando por 30 min a 25°C y 1000 rpm. Pasado el tiempo, se centrifugó a 12000 rpm por 5 min y se midió actividad al sobrenadante y al precipitado lavado 3 veces con 1 mL de amortiguador MES-NaCl pH 5, el cual fue resuspendido finalmente en 1.125 mL de amortiguador fosfatos 100 mM pH 7.

### **8.6. Efecto de diferentes condiciones de preparación en las propiedades de los CRL-CLEAs**

En esta etapa se prepararon diferentes CRL-CLEAs para lo cual se modificaron 3 factores durante su preparación: 1) la cantidad de BSA adicionada durante el entrecruzamiento (0, 10, 30 ó 50 mg), 2) el grado de entrecruzamiento de la enzima, modificando la concentración de EDC-NHS (13, 20, 28, 35 y 40 mM) y 3) la longitud de cadena del agente de entrecruzamiento (DH ó PEI<sub>1.3</sub> ó PEI<sub>25</sub> ó PEI<sub>70</sub> ó PEI<sub>750</sub>). Las variables respuesta evaluadas para los diferentes CRL-CLEAs preparados fueron: actividad específica, actividad recuperada, tamaño, morfología, termoestabilidad a 50°C y enantioselectividad sobre el ácido 2-*O*-butiril-2-fenilacético. Los CLEAs que mostraron mejores características catalíticas, fueron comparados con CRL-CLEAs entrecruzados por sus grupos amino mediante entrecruzamiento con glutaraldehído (amino-CLEAs). Ambos CLEAs (amino- y carboxilo-) fueron preparados bajo condiciones de reacción muy similares.

#### **8.6.1. Inmovilización de la CRL en forma de CLEAs por entrecruzamiento de sus grupos carboxilo con polietileniminas**

En tubos cónicos Falcon de 15 mL se colocaron 100 mg de la CRL más BSA (0, 10, 30 ó 50 mg) ambas en polvo. A dicha mezcla se adicionaron 2 mL de una solución de trioctanoína en acetonitrilo (0.2 mg/mL) y se mantuvieron en un baño de hielo durante 1 h a 4°C. Posteriormente, se adicionaron gota a gota 250 µL de EDC disuelto en acetonitrilo (para solubilizar el EDC en acetonitrilo; se adicionó ácido clorhídrico en una relación molar 1:1; esta solución fue preparada 1 h antes de su aplicación y mantenida a temperatura ambiente). Después de 5 min de reacción, se adicionaron gota a gota 250 µL de NHS disuelto en acetonitrilo, y se mantuvo bajo agitación con vortex durante 5 min (el EDC y el NHS se adicionaron siempre a la misma concentración molar). A continuación, se adicionaron gota a gota 250 µL del agente de entrecruzamiento disuelto en agua destilada (DH ó PEI<sub>1.3</sub> ó PEI<sub>25</sub> ó PEI<sub>70</sub> ó PEI<sub>750</sub>) a una concentración final de 3 g/L y se dejaron reaccionar por 30 min a 25°C y 750 rpm. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada a 10000 rpm a 4°C por 5 min y se descartó la fase orgánica. Para regenerar las posibles tirosinas modificadas por acción del EDC, el precipitado

fue resuspendido en 10 mL de una solución de hidroxilamina disuelta en amortiguador MES-NaCl (0.1 y 0.5 M, respectivamente) pH 5 (la concentración de hidroxilamina fue siempre 5 veces mayor a la concentración de EDC empleada) y se dejó reaccionar por 1 h a 25°C y 750 rpm. Terminado el tratamiento, los CLEAs fueron nuevamente centrifugados a 10000 rpm por 5 min a 4°C y lavados 3 veces más (10 mL por lavado) con amortiguador MES-NaCl respectivamente para remover el EDC, el NHS y la hidroxilamina remanentes. Finalmente, fueron suspendidos en amortiguador de fosfatos 25 mM pH 7 y almacenados a -20°C.

### **8.6.2. Inmovilización de la CRL en forma de CLEAs por entrecruzamiento de sus grupos amino con glutaraldehído**

En tubos cónicos Falcon de 15 mL se colocaron 100 mg de la CRL más 10 mg de BSA ambas en polvo. A dicha mezcla se adicionaron 2 mL de una solución de trioctanoína en acetonitrilo (0.2 mg/mL) y se mantuvieron en un baño de hielo durante 1 h a 4°C. Posteriormente, se adicionaron simultáneamente 750 µL de glutaraldehído (56 mM disuelto en acetonitrilo) y 250 µL de PEI<sub>1,3</sub> (3 g/L solución acuosa). Se dejaron reaccionar por 30 min a 25°C y 750 rpm. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada a 10000 rpm a 4°C por 5 min y se descartó la fase orgánica. El precipitado fue resuspendido en 10 mL de amortiguador MES-NaCl (0.1 y 0.5 M, respectivamente) a pH 5. Después los CLEAs fueron centrifugados a 10000 rpm por 5 min y lavados 3 veces más con el mismo volumen de amortiguador MES-NaCl. Finalmente, fueron suspendidos en amortiguador de fosfatos 25 mM pH 7 y almacenados a -20°C.

### **8.6.3. Termoestabilidad**

La termoestabilidad de los CLEAs, así como la de los derivados de la CRL en soportes de agarosa, se midió en amortiguador acuoso (25 mM de fosfato de sodio, pH 7) en condiciones de agitación (200 rpm) a 50°C durante 22 horas (o hasta haber alcanzado por lo menos el 50% de pérdida de la actividad). En el caso de los CLEAs, se emplearon 2 mL de una suspensión con 30-40 µg de proteína/mL; y en el caso de los derivados en soporte una suspensión de 200 mg de derivado en 2 mL de amortiguador fosfatos 25 mM pH 7. Se midió la actividad hidrolítica residual como en 8.1 (*p*NPB). La actividad residual se calculó como el coeficiente de la actividad después de cada tratamiento entre la actividad inicial de cada muestra multiplicado por 100.

#### 8.6.4. Morfología de los CLEAs

La morfología y tamaño de los CLEAs se determinó mediante micrografías de escaneo electrónico de suspensiones de CLEAs en agua destilada empleando un microscopio de escaneo electrónico marca Hitachi TM-1000 (SEM).

#### 8.6.5. Estabilidad en solventes orgánicos

Para determinar la estabilidad de los CLEAs en solventes orgánicos, así como la de los derivados de la CRL en soportes de agarosa, 2 mL de una suspensión del biocatalizador (en el caso de los CLEAs 30-40 µg de proteína/mL; y en el caso de los derivados en soporte una suspensión de 200 mg de derivado en 2 mL de amortiguador fosfatos 25 mM pH 7) se adicionaron a 2 mL de solvente orgánico (ciclohexano ó etanol) y se incubó por 160 h a 25°C (o hasta alcanzar por lo menos 50% de pérdida de la actividad). Se midió la actividad residual como en 8.1 (pNPB) tomando alícuotas de 50 µL de cada muestra. La actividad residual se calculó como el coeficiente de la actividad después de cada tratamiento entre la actividad inicial de cada muestra multiplicado por 100.

#### 8.7. Preparación de derivados inmovilizados de la CRL sobre soportes de agarosa

Durante esta etapa se prepararon diferentes derivados de la CRL inmovilizados sobre soportes de agarosa 6BCL los cuales permitieron la inmovilización de la enzima con diferentes orientaciones. Para ello se emplearon soportes de agarosa activados con grupos: 1) bromo cianógeno (BrCN-agarosa), 2) Glioxilo (Glioxil-agarosa), 3) monoamino-N-aminoetilo (MANAE-agarosa), 4) monoamino-N-aminoetil con glutaraldehído (MANAE-GA-agarosa), 4) octilo (octil-agarosa) y 5) naftilo (naftil-agarosa).

##### 8.7.1. Inmovilización de la CRL sobre soporte BrCN – agarosa

Previo al procedimiento de inmovilización, el soporte comercial fue activado añadiendo 0.5 g de soporte seco a 5 mL de agua acidificada con ácido clorhídrico a pH 2. La mezcla se mantuvo en agitación suave en un mezclador de palas durante 15 min a 25°C. Finalmente, se filtró con un embudo Buchner de vidrio marca POBEL equipado con una placa perforada del No. 2 y se utilizó inmediatamente.

La inmovilización de la CRL por unión covalente del amino terminal se llevó a cabo siguiendo una metodología previamente descrita (Mateo *et al.*, 2005). Para ello, 10 mL de una solución de la CRL (1, 10 ó 100 mg de preparación comercial en 10 mL de amortiguador de fosfatos 25 mM pH 7 con 0.05% p/v de Triton X-100) fueron añadidos a 1 g de agarosa activada

con bromo cianógeno (BrCN-agarosa). El uso del detergente fue para evitar la inmovilización de dímeros lipasa-lipasa (Wilson *et al.*, 2006b). Esta suspensión se mantuvo bajo agitación suave en un mezclador de rodillos a 4°C. Después de 7 min de reacción, la inmovilización fue detenida por filtración empleando un embudo Buchner de vidrio marca POBEL equipado con una placa perforada del No. 2. Para bloquear los grupos bromo cianógeno libres remanentes en el soporte, el derivado filtrado fue suspendido en 10 mL de etanolamina 1 M a pH 7 e incubado por 2 h a 4°C. A continuación, la preparación fue filtrada y lavada con 10 volúmenes de agua destilada y finalmente enjuagada con amortiguador de fosfatos 25 mM pH 7 para remover el detergente y la etanolamina. Finalmente se filtró y almacenó a 4°C.

### **8.7.2. Inmovilización de la CRL sobre soporte octil – agarosa**

En base a reportes previos (Bastida *et al.*, 1998), la inmovilización de la CRL por adsorción hidrofóbica de la lipasa sobre el soporte se realizó añadiendo 10 mL de una solución de la CRL (1, 10 ó 100 mg de preparación comercial en 10 mL de amortiguador de fosfatos 25 mM pH 7) a 1 g de octil-agarosa. En este caso no se empleó detergente ya que éste evita la adsorción de la lipasa en el soporte hidrofóbico. Esta suspensión se mantuvo bajo agitación suave en un mezclador de rodillos a 25°C. Se siguió el curso de la inmovilización midiendo la actividad en el sobrenadante y en la suspensión cada 30 min hasta alcanzar el 100 % de adsorción de la enzima en el soporte (aproximadamente 1 h a cargas bajas y 4 h a cargas altas) reflejado en la pérdida de actividad en el sobrenadante. Así mismo, se midió la actividad de un control de enzima en las mismas condiciones de inmovilización pero sin el soporte, para calcular la pérdida de actividad debida a las condiciones y tiempo de reacción. La inmovilización fue detenida por filtración empleando un embudo Buchner de vidrio marca POBEL equipado con una placa perforada del No. 2. El derivado fue filtrado y lavado con 10 volúmenes de amortiguador de fosfatos 25 mM pH 7 y finalmente enjuagado con el mismo amortiguador para ser almacenado a 4°C.

### **8.7.3. Inmovilización de la CRL sobre soporte Naftil – agarosa**

Como primera parte se preparó el soporte de agarosa activado con grupos naftilo (naftil-agarosa). El procedimiento constó de dos pasos: 1) activación de agarosa con grupos epóxido y 2) activación de los grupos epóxido con grupos naftilo. Para preparar la epoxi-agarosa se empleó una metodología previamente reportada (Mateo *et al.*, 2000a), que consistió en preparar una suspensión de agarosa (55 g lavada con agua destilada y filtrada) en acetona (80 mL). A dicha suspensión se adicionaron 220 mL de una solución acuosa de NaOH 1 M, seguida de la adición de 1 g de borohidruro de sodio. La mezcla se colocó en un baño de hielo y lentamente se le

gotearon 55 mL de epíclorhidrina. Se mantuvo agitado con un mezclador de palas durante 16 h a 25°C. Al terminar, se enjuagó con abundante agua destilada. Una vez obtenida la epoxi-agarosa, se procedió a activar los grupos epóxido con grupos naftilo (Smyth *et al.*, 1978). El procedimiento consistió en preparar una suspensión de 10 g de epoxi-agarosa en 100 mL de tionaftaleno 15 mM en una mezcla agua/dimetilsulfóxido (20:80). Esta suspensión se mantuvo agitado con un mezclador de palas durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó 10 veces con 100 mL en cada lavado, de una solución agua/acetona (20:80). Una vez preparada la naftil-agarosa, se procedió a inmovilizar con el mismo procedimiento que en 8.7.2. pero empleando el soporte preparado previamente. Los tiempos de inmovilización fueron desde 20 min para la carga más baja, hasta 2 h para la carga más alta.

#### **8.7.4. Inmovilización de la CRL sobre soporte glioxil – agarosa**

Se comenzó con la preparación del soporte de agarosa activado con grupos glioxilo (glioxil-agarosa) la cual constó de 2 pasos: 1) activación de los grupos hidroxilo de la agarosa con grupos glicerilo (gliceril-agarosa) y 2) activación de los grupos glicerilo en grupos glioxilo (glioxil-agarosa) (Guisán, 1988). El primer paso partió de 105 g de agarosa (filtrada y lavada con agua destilada) a los que se adicionaron 30 mL de agua destilada. A dicha suspensión se adicionaron 50 mL de NaOH 1.7 N a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 1.425 g de borohidruro de sodio manteniendo la mezcla en un baño de hielo. Después, lentamente se adicionaron gota a gota 36 mL de glicidol. La suspensión se mantuvo en agitación con palas a temperatura ambiente durante 16 h. Al finalizar, la gliceril-agarosa se filtró y lavó con abundante agua destilada. Para el segundo paso, a 10 g de gliceril-agarosa se adicionaron 100 mL de peryodato de sodio 10 mM y se mantuvieron en agitación en un mezclador de rodillos hasta conseguir la oxidación de todos los dioles (aproximadamente 1 h a temperatura ambiente). Para medir el grado de oxidación de los dioles de la gliceril-agarosa, se tomaron 100 µL de sobrenadante (suspensión centrifugada) y se mezclaron con 1 mL de una mezcla 50:50 de yoduro de potasio (10% p/v) y bicarbonato de sodio saturado. Se midió la absorbancia a 405 nm, comparándola con la absorbancia inicial de la solución de peryodato de sodio 10 mM (la disminución de la coloración amarilla del NaIO<sub>4</sub> al reaccionar con el KI, se empleó como indicador del consumo del NaIO<sub>4</sub> por los dioles de la gliceril-agarosa). Una vez activados todos los grupos glicerilo con grupos glioxilo, se filtró y se lavó con abundante agua. Finalmente se equilibró 5 min con 100 mL de amortiguador de fosfato de sodio 25 mM pH 7, se filtró y almacenó a 4°C.

Para la inmovilización de la CRL sobre el soporte glioxil-agarosa por reacción química entre las lisinas superficiales de la enzima y los grupos glioxilo del soporte se siguió una técnica previamente descrita (Guisán, 1988). A 10 mL de solución de la CRL (1, 10 ó 100 mg de preparación comercial en 10 mL de amortiguador bicarbonato de sodio 100 mM pH 10 con 40% polietilenglicol y 0.05% p/v de Triton X-100) se adicionó 1 g del soporte. El polietilenglicol se empleó como estabilizante de la CRL en condiciones de pH alcalino. La suspensión se mantuvo bajo agitación en un mezclador de rodillos a 4°C siguiendo el curso de la inmovilización para lo cual se midió la actividad en el sobrenadante y en la suspensión hasta alcanzar el 100% de inmovilización de la enzima en el soporte reflejado en la pérdida de actividad en el sobrenadante. La unión de la totalidad de enzima adicionada sobre el soporte se alcanzó rápidamente (15-30 min dependiendo de la carga enzimática); sin embargo, la inmovilización no se detuvo hasta pasadas las 24 h a 4°C para garantizar la formación de múltiples enlaces enzima-soporte. Para calcular la pérdida de actividad debida a las condiciones y tiempo de reacción, se midió la actividad de una solución de enzima en las mismas condiciones de inmovilización pero sin el soporte. Pasado el tiempo, se adicionó borohidruro de sodio (1 mg/mL de suspensión) y se dejó reduciendo por 30 min a temperatura ambiente. Terminada la reducción, se lavó con abundante agua para eliminar el borohidruro remanente y el detergente. Finalmente, se equilibró 5 min con 10 mL de amortiguador de fosfato de sodio 25 mM pH 7, se filtró y almacenó a 4°C.

#### **8.7.5. Inmovilización de la CRL sobre soporte MANAE – agarosa**

La preparación del soporte de agarosa activado con grupos monoamino-N-aminoetil (MANAE-agarosa) se realizó de acuerdo a una metodología descrita (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1993). Para ello, a 10 g de glioxil agarosa (preparada como en 8.7.4) se añadieron 100 mL de etilendiamina 2 M a pH 11. Dicha suspensión se mantuvo en agitación en un mezclador de rodillos durante 16 h. Pasado el tiempo de reacción, las bases de Schiff formadas fueron reducidas adicionando 10 mg/mL de borohidruro de sodio y se dejaron reaccionar por 2 horas a 25°C en el mezclador de rodillos. Posteriormente, se filtró el soporte y se lavó con abundante agua (4 L). Finalmente, se equilibró 5 min con 100 mL de amortiguador de fosfato de sodio 25 mM pH 7, se filtró y almacenó a 4°C.

La inmovilización de la CRL mediante adsorción por intercambio iónico con el soporte MANAE-agarosa se llevó a cabo en base a una metodología previamente descrita (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1993). Diez mililitros de una solución de la CRL (1, 10 ó 100 mg de preparación comercial en 10 mL de amortiguador de fosfatos 25 mM pH 7 con 0.05% p/v de Triton X-100)

fueron añadidos a 1 g de MANAE-agarosa. El uso del detergente fue para evitar la inmovilización de dímeros de lipasa-lipasa (Wilson *et al.*, 2006b). Esta suspensión se mantuvo bajo agitación en un mezclador de rodillos a 4°C. Para seguir el curso de la inmovilización se midió la actividad en el sobrenadante y en la suspensión cada 5 min hasta alcanzar el 100% de adsorción de la enzima en el soporte (aproximadamente 30 min), reflejado en la pérdida de actividad en el sobrenadante. Para calcular la pérdida de actividad debida a las condiciones y tiempo de reacción se midió la actividad de un control de enzima en las mismas condiciones de inmovilización pero sin el soporte. La inmovilización fue detenida por filtración empleando un embudo Buchner de vidrio marca POBEL equipado con una placa perforada del No. 2. El derivado fue filtrado y lavado con 10 volúmenes de amortiguador de fosfatos 25 mM pH 7 y finalmente enjuagado con el mismo amortiguador para remover el detergente y después ser almacenado a 4°C.

#### **8.7.6. Inmovilización de la CRL sobre soporte GA – agarosa**

Para la preparación del soporte MANAE-agarosa activado con glutaraldehído (GA-agarosa) se siguió una metodología previamente descrita (Betancor *et al.*, 2006; López-Gallego *et al.*, 2005b). A 10 g de soporte MANAE-agarosa se adicionaron 100 mL de glutaraldehído (15% en amortiguador de fosfatos 200 mM, pH 7). La suspensión se mantuvo en la oscuridad bajo agitación en un mezclador de rodillos a 25°C durante 16 h. Al finalizar, se filtró y lavó con amortiguador de fosfatos 25 mM pH 7 para ser usada inmediatamente después de su preparación.

La inmovilización de la CRL sobre el soporte GA-agarosa por adsorción iónica y unión covalente de los residuos de lisina de la enzima se llevó a cabo en base a una metodología descrita (López-Gallego *et al.*, 2005b). Para ello, se adicionaron 10 mL de solución de la CRL (1, 10 ó 100 mg de preparación comercial en 10 mL de amortiguador fosfatos 25 mM pH 7 con 0.05% p/v de Triton X-100) a 1 g de soporte recién preparado. El uso del detergente fue para evitar la inmovilización de dímeros lipasa-lipasa (Wilson *et al.*, 2006b). La suspensión se mantuvo bajo agitación en un mezclador de rodillos a 4°C. Para seguir el curso de la inmovilización, se midió la actividad en el sobrenadante y en la suspensión cada 5 min hasta alcanzar el 100% de adsorción de la enzima en el soporte (aproximadamente 30 min), reflejado en la pérdida de actividad en el sobrenadante. Para calcular la pérdida de actividad debida a las condiciones y tiempo de reacción, se midió la actividad de un control de enzima en las mismas condiciones de inmovilización pero sin el soporte. La inmovilización fue detenida por filtración empleando un embudo Buchner de vidrio marca POBEL equipado con una placa perforada del

No. 2. El derivado fue filtrado y lavado con 10 volúmenes de amortiguador de fosfatos 25 mM pH 7 para remover el detergente y el glutaraldehído remanentes y después ser almacenado a 4°C.

### **8.8. Modificación química y/o física de los derivados inmovilizados de la CRL**

En esta etapa se procedió a preparar derivados inmovilizados de la CRL modificando la superficie de la enzima inmovilizada. Los protocolos de modificación aplicados fueron: 1) aminación, 2) succinilación, 3) adición de cadenas alifáticas y 4) recubrimiento con polietilenimina. Dichas modificaciones se realizaron tanto para los derivados inmovilizados en forma de CLEAs, así como para los derivados inmovilizados sobre soportes de agarosa.

#### **8.8.1. Aminación de los grupos carboxilo de la enzima inmovilizada**

El procedimiento de aminación se realizó de acuerdo con una metodología previamente descrita (Palomo *et al.*, 2007a). Se mezcló el precipitado de 10 mL de una suspensión de CLEAs (30-40 µg de proteína por mililitro) ó 1 g de derivado de la CRL inmovilizado sobre soporte con 10 mL de una solución 10 mM de EDC y 1 M de etilendiamina a pH 4.75. Se mantuvo bajo agitación suave en un mezclador de rodillos durante 1.5 h a 25°C manteniendo el pH constante. Pasado el tiempo de reacción, la suspensión fue filtrada y lavada con abundante agua destilada para remover toda la etilendiamina y la EDC remanentes. Con el objetivo de regenerar las tirosinas que pudieron haber sido modificadas por la EDC (Carraway *et al.*, 1969), los derivados aminados fueron incubados por 2 h en 10 mL de hidroxilamina 0.1 M pH 7 a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, se lavó con amortiguador de fosfatos 25 mM pH 7. Finalmente, se filtró y almacenó a 4°C.

#### **8.8.2. Succinilación de los grupos amino de la enzima inmovilizada**

La succinilación de la CRL se llevó a cabo siguiendo una metodología reportada (Fernández-Lorente *et al.*, 2012). Se mezcló el precipitado de 10 mL de una suspensión de CLEAs (30-40 µg de proteína por mililitro) ó 1 g de derivado de la CRL inmovilizado sobre soporte con 10 mL de una solución de anhídrido succínico 100 mM en amortiguador fosfatos 200 mM a pH 8. Esta suspensión se mantuvo en agitación suave a 25°C por 2 h, manteniendo el pH constante. Finalmente, el derivado succinilado fue filtrado y lavado con abundante amortiguador de fosfatos 25 mM pH 7 y almacenado a 4°C.

### 8.8.3. Modificación de los grupos amino de la enzima inmovilizada por adición de cadenas alifáticas en los residuos de lisinas

De acuerdo con una metodología descrita (Franco *et al.*, 1996) con algunas modificaciones, se mezcló el precipitado de 10 mL de una suspensión de CLEAs (30-40 µg de proteína por mililitro) ó 1 g de derivado de la CRL inmovilizado sobre soporte con 30 mL de una mezcla bifásica 1:2 de amortiguador de fosfato de sodio 200 mM pH 8.0 y 15% de anhídrido hexanóico en triclorometano. Dicha mezcla se mantuvo bajo agitación vigorosa durante 4 h a 25°C. Finalmente, el derivado modificado con cadenas alifáticas se filtró y lavó exhaustivamente con abundante agua destilada y se almacenó a 4°C.

### 8.8.4. Recubrimiento con PEI

El recubrimiento de la CRL con polietilenimina se realizó en base a una metodología reportada (Cabrera *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2009) con algunas modificaciones. Para ello, se mezcló el precipitado de 10 mL de una suspensión de CLEAs (30-40 µg de proteína por mililitro) ó 1 g de derivado de la CRL inmovilizado sobre soporte con 16 mL de una solución de PEI de 25 kDa (25 mg/mL a pH 7). Se mantuvo bajo agitación suave a 4°C durante 16 h. Finalmente, el derivado recubierto con PEI se filtró y lavó con abundante amortiguador de fosfatos 25 mM pH 7. Posteriormente fue almacenado a 4°C.

## 8.9. Estudio de la enantioselectividad de los diferentes derivados de la CRL

### 8.9.1. Hidrólisis del ácido 2-*O*-butiril-2-fenilacético (BFA)

La reacción de hidrólisis de la mezcla racémica del ácido 2-*O*-butiril-2-fenilacético (*rac*-BFA) se llevó acabo de acuerdo con una metodología descrita (Wilson *et al.*, 2006a) y modificada. Para ello, se añadió el precipitado de 10 mL de suspensión de CLEAs (30-40 µg de proteína por mililitro) ó 500 mg de derivado de la CRL inmovilizado sobre soporte a 3 mL de *rac*-BFA 5 mM en amortiguador de acetatos 10 mM pH 5. Las mezclas fueron mantenidas bajo agitación a 25°C hasta alcanzar 10-15% de hidrólisis. Los sustratos y productos de la reacción enzimática fueron analizados con un equipo HPLC (Spectra System P4000) acoplado a un detector UV de arreglo de diodos (Spectra System SN4000) empleando una columna de fase reversa Kromasil C18 (25 cm x 0.4 cm). La elución de los compuestos fue llevada a cabo con una fase móvil de un amortiguador de acetato de amonio 10 mM pH 3.2 en una mezcla acetonitrilo/agua (35:65, v/v), a un flujo constante de 1.0 mL/min. La absorbancia de los compuestos fue medida a 210 nm. Los tiempos de retención para el ácido mandélico racémico y

para el *rac*-BFA fueron 2.3 y 14.3 min, respectivamente. Se definió una unidad de actividad como la cantidad de enzima necesaria para liberar un  $\mu\text{mol}$  de *S* ó *R* ácido mandélico por minuto. La conversión se calculó a través del área de los picos relacionada con una curva estándar realizada en las mismas condiciones.

El *ee* del ácido mandélico liberado se determinó mediante HPLC de fase reversa quiral, de acuerdo con lo reportado (Fernández-Lorente *et al.*, 2005). Para asegurar que la cinética enzimática se encontraba en una región de primer orden, sólo se trabajó con muestras con una conversión del 10-15% de hidrólisis del sustrato. Para separar los enantiómeros del ácido mandélico se empleó una columna quiral Chiralcel OD-R (250 mm x 4.6 mm), con una fase móvil isocrática de amortiguador de fosfato de amonio 10 mM a pH 2.3 en una mezcla acetonitrilo/agua (5:95, v/v), con un flujo de 0.5 mL/min, midiendo la absorbancia a 210 nm. Los tiempos de retención para los enantiómeros *S* y *R* del ácido mandélico fueron: 28.5 min y 32.5 min, respectivamente. La enantioselectividad (*E*) fue directamente calculada de la relación entre las tasas de reacción de ambos isómeros. De acuerdo con (Wernerova & Hudlicky, 2010), se realizó una curva de calibración para cada uno de los isómeros del ácido mandélico a concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 ppm. A concentraciones de 100 ppm se aplicó un factor de corrección de 1.037 para el isómero *S*, el cual presentó una menor respuesta que el isómero *R*. El *ee* del ácido mandélico liberado se calculó empleando una ecuación reportada (Chen *et al.*, 1982).

### 8.9.2. Hidrólisis enantioselectiva del 1-feniletil acetato (FEA)

La hidrólisis enzimática del 1-feniletil acetato (FEA), partiendo de la mezcla racémica del sustrato (*rac*-FEA), se llevó a cabo añadiendo el precipitado de 10 mL de suspensión de CLEAs (30-40  $\mu\text{g}$  de proteína por mililitro) ó 500 mg de derivado de la CRL inmovilizado sobre soporte a 3 mL de *rac*-FEA 5 mM en amortiguador 10 mM (Tris ó acetato de sodio para pH 7 ó pH 5, respectivamente). La reacción fue mantenida bajo agitación (a 25°C ó 4°C, según el caso estudiado) hasta alcanzar un 10-15% de hidrólisis. Para determinar el grado de hidrólisis del sustrato, las muestras de reacción se analizaron empleando un equipo de HPLC (Spectra System P4000) acoplado a un detector UV de arreglo de diodos (Spectra System SN4000) con una columna de fase reversa Kromasil C18 (25 cm x 0.4 cm). La elución de los compuestos fue llevada a cabo con una fase móvil de un amortiguador de fosfato de amonio 10 mM pH 7.0 en una mezcla acetonitrilo/agua (35:65, v/v), a un flujo constante de 1.0 mL/min. La absorbancia de los compuestos fue medida a 205 nm. Los tiempos de retención para el *rac*-1-feniletanol y

para el *rac*-FEA fueron 4.6 y 22.0 min, respectivamente. Se definió una unidad de actividad como la cantidad de enzima necesaria para liberar un  $\mu\text{mol}$  de *R* ó *S* 1-feniletanol por minuto. La conversión se calculó a través del área de los picos relacionada con una curva estándar realizada en las mismas condiciones.

El *ee* del (*S*)-1-feniletanol liberado se determinó mediante HPLC de fase reversa quiral (Spectra System P4000) acoplado a un detector UV de arreglo de diodos (Spectra System SN4000) con una columna quiral Chiralcel OD-R (250mm x 4.6mm). Para asegurar que la cinética enzimática se encontraba en una región de primer orden, sólo se trabajó con muestras con una conversión del 10-15% de hidrólisis del sustrato. Para separar los enantiómeros del 1-feniletanol, se empleó una fase móvil isocrática de amortiguador fosfato de amonio 10 mM a pH 7.0 en una mezcla acetonitrilo/agua 35:65, v/v), con un flujo de 0.5 mL/min, midiendo la absorbancia a 205 nm. Los tiempos de retención para los enantiómeros *S* y *R* del 1-feniletanol: 13.5 min y 14.7 min, respectivamente. La enantioselectividad (*E*) fue directamente calculada de la relación entre las tasas de reacción de ambos isómeros. El *ee* del 1-feniletanol liberado se calculó empleando una ecuación reportada (Chen *et al.*, 1982).

### 8.9.3. Hidrólisis enantioselectiva del 2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo (HFBE)

La hidrólisis enzimática del 2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo (HFBE) partiendo de la mezcla racémica (*rac*-HFBE), se llevó a cabo de acuerdo con una metodología reportada (Fernández-Lorente *et al.*, 2001). Para ello, se añadió el precipitado de 10 mL de suspensión de CLEAs (30-40  $\mu\text{g}$  de proteína por mililitro) ó 500 mg de derivado de la CRL inmovilizado sobre soporte a 3 mL de *rac*-HFBE 5mM en amortiguador 10 mM (acetato de sodio ó fosfato de sodio para pH 5 ó pH 7, respectivamente). La reacción fue mantenida bajo agitación (a 25°C ó 4°C, según el caso estudiado) hasta alcanzar un 10-15% de hidrólisis. Para determinar el grado de hidrólisis del sustrato, las muestras de reacción se analizaron empleando un equipo de HPLC (Spectra System P4000) acoplado a un detector UV de arreglo de diodos (Spectra System SN4000) con una columna de fase reversa Kromasil C18 (25 cm x 0.4 cm). La elución de los compuestos fue llevada a cabo con una fase móvil de un amortiguador de acetato de amonio 10 mM pH 2.3 en una mezcla acetonitrilo/agua (40:60, v/v), a un flujo constante de 1.0 mL/min. La absorbancia de los compuestos fue medida a 225 nm. Los tiempos de retención para la mezcla racémica de productos, ácido 2-hidroxi-4-fenilbutanóico (*rac*-AHFB), y para el sustrato *rac*-HFBE fueron 3.2 y 10.2 min, respectivamente. Se definió una unidad de actividad como la cantidad de enzima necesaria para liberar un  $\mu\text{mol}$  de *R* ó *S* -AHFB por minuto. La conversión

se calculó a través del área de los picos relacionada con una curva estándar realizada en las mismas condiciones.

El *ee* del *R*-HFBE liberado se determinó mediante HPLC de fase reversa quirál (Spectra System P4000) acoplado a un detector UV de arreglo de diodos (Spectra System SN4000) con una columna quirál Chiralcel OD-R (250 mm x 4.6 mm). Para asegurar que la cinética enzimática se encontraba en una región de primer orden, se trabajó con muestras con una conversión del 10-15% de hidrólisis del sustrato. Para separar los enantiómeros del HFBE, se empleó una fase móvil isocrática de amortiguador fosfato de amonio 10 mM a pH 2.3 en una mezcla acetonitrilo/agua 20:80, v/v), con un flujo de 0.5 mL/min, midiendo la absorbancia a 225 nm. Los tiempos de retención para los enantiómeros *S*- y *R*- HFBE: 23.1 min y 25.3 min, respectivamente. La enantioselectividad (*E*) fue directamente calculada de la relación entre las tasas de hidrólisis de ambos isómeros del sustrato. El *ee* del (*R*)-HFBE remanente se calculó empleando una ecuación descrita (Chen *et al.*, 1982).

#### **8.10. Aplicación de los derivados inmovilizados de la CRL en la hidrólisis del aceite de sardina**

Mediante la hidrólisis del aceite de sardina se llevó a cabo la liberación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). Para ello, se siguió la metodología reportada por (Fernández-Lorente *et al.*, 2012). En un frasco de 20 mL de vidrio con tapa que contenía 10 mL una mezcla de 0.5 mL de aceite de sardina, 4.5 mL de ciclohexano y 5 mL de amortiguador fosfato de sodio 100 mM pH 6, se añadió el precipitado de 10 mL de suspensión de CLEAs (30-40 µg de proteína por mililitro) ó 300 mg de derivado de la CRL inmovilizado sobre soporte. Los frascos con dicha mezcla de reacción, se taparon y mantuvieron a 25°C bajo agitación a 750 rpm con un agitador magnético. A diferentes intervalos de tiempo se tomaron muestras de la reacción retirando 50 µL de la fase orgánica, disolviéndolos en 0.8 mL de acetonitrilo. Dichas muestra se analizaron mediante un equipo HPLC (Spectra Physic HPLC-UV) acoplado a un detector de UV (SP 100-UV detector SP 8450) con una columna Kromasil C8 (15 x 0.4 mm). Las muestras fueron eluidas con una fase móvil acetonitrilo/agua/ácido acético (70:30:0.1) pH 3 a un flujo isocrático de 1 mL/min. Los PUFAs fueron detectados a 215nm, cuyos tiempos de retención fueron 10.4 min y 13.1 min, para el EPA y DHA, respectivamente. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar un µmol de ácido eicosepentaenóico (EPA) ó ácido docosahexaenóico (DHA) por minuto bajo las condiciones mencionadas.

# 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente tesis se desarrolló una metodología de preparación de CLEAs de la CRL entrecruzados con PEI vía la activación de los grupos carboxilo de la enzima mediante la adición de EDC-NHS. Para ello, se comenzó con la selección de un agente y condiciones de precipitación para la enzima modelo de estudio (CRL). Posteriormente, se identificaron las variables del proceso que incidían en la efectividad de entrecruzamiento de la metodología propuesta. Una vez establecida la metodología de preparación, se construyeron CLEAs bajo diferentes condiciones (concentración de EDC-NHS, adición de BSA y longitud de cadena de la PEI). A continuación, se procedió a evaluar las propiedades catalíticas de dichos CLEAs (actividad específica, actividad recuperada, tamaño, morfología, estabilidad térmica y enantioselectividad).

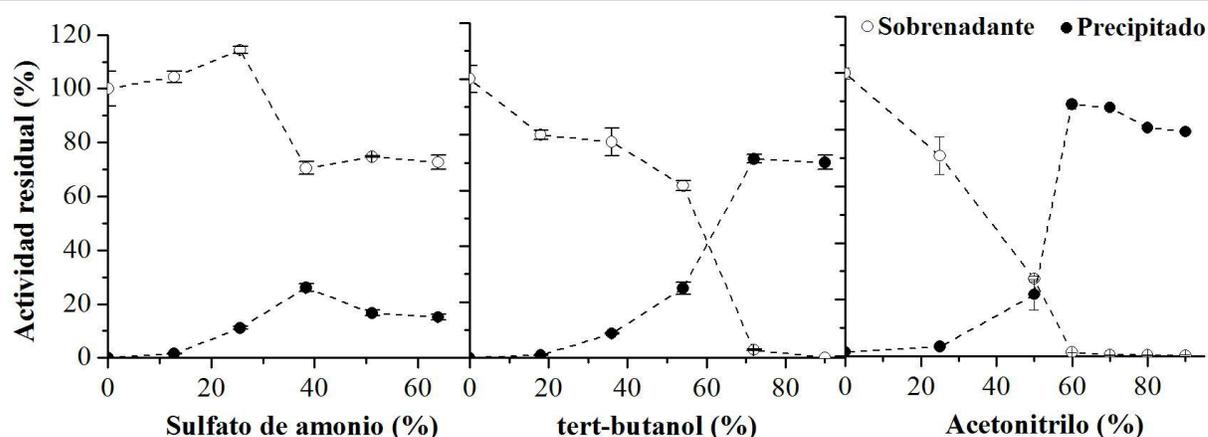
Por otra parte, se prepararon derivados de la CRL inmovilizados sobre soportes persistentes de agarosa (glioxil-agarosa, octil-agarosa, BrCN-agarosa, MANAE-agarosa, GA-agarosa y naftil-agarosa). Una vez obtenidos los derivados inmovilizados de la CRL en forma de CLEAs y sobre soportes de agarosa se evaluó su estabilidad y su enantioselectividad en 2 reacciones modelo. En este estudio se empleó la combinación de la ingeniería del medio de reacción y la modificación química y/o física de la enzima inmovilizada para la modulación y mejora de la enantioselectividad de la CRL; ya que el empleo en conjunto de estas técnicas ha demostrado ser una herramienta exitosa para la mejora de la enantioselectividad de las lipasas (Mateo *et al.*, 2010; Mateo *et al.*, 2007b; Palomo, 2009; Rodrigues *et al.*, 2011).

### **9.1. Selección de agente y condiciones de precipitación de la CRL**

Durante las etapas de preparación de los CLEAs el proceso de precipitación de las proteínas juega un papel importante en el resultado final de los biocatalizadores así inmovilizados (Talekar *et al.*, 2013). Dentro de los agentes de precipitación más empleados para la preparación de CLEAs podemos encontrar sales como el sulfato de amonio, algunos solventes orgánicos como el *tert*-butanol, acetona, etanol, acetonitrilo; y también polímeros no iónicos/iónicos como el polietilenglicol (PEG) y la polietilenimina, entre otros. El mecanismo de acción de cada uno de ellos es distinto. Por un lado, las sales como el sulfato de amonio actúan modificando la fuerza iónica del medio, mientras que los solventes orgánicos modifican la constante dieléctrica del solvente (Nelson & Cox, 2008). Los polímeros no iónicos/iónicos actúan formando complejos reversibles proteína-polímero mediados por interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas (Cooper *et al.*, 2005). Como resultado, el empleo de cada uno de

estos agentes para la precipitación de enzimas provoca una distinta conformación tridimensional de las enzimas así precipitadas. Dicha conformación enzimática puede presentarse en una forma activa o inactiva, por lo que no siempre el agente precipitante que menos desnaturaliza una enzima después de su resolubilización es aquel que resulta en la formación de CLEAs más activos (Kartal *et al.*, 2011; López-Serrano *et al.*, 2002; Prabhavathi Devi *et al.*, 2009; Talekar *et al.*, 2013).

Para llevar a cabo la precipitación de la CRL se probaron tres agentes precipitantes: sulfato de amonio, *tert*-butanol y acetonitrilo (Fig. 40). El acetonitrilo mostró la mayor capacidad precipitante logrando insolubilizar el 100% de la enzima a concentraciones mayores al 60% v/v, causando un daño máximo del 15% en la actividad enzimática recuperada; mientras que el *tert*-butanol requiere estar a una concentración mayor al 70% para precipitar el 100% de la enzima además de causar un daño del 30% en la actividad recuperada. El sulfato de amonio mostró la menor capacidad precipitante, ya que no logró precipitar más del 30% de la enzima a ninguna de las concentraciones probadas (Fig. 40). Sin embargo, posteriormente se cambió la forma de adición del sulfato de amonio para la precipitación, en vez de adicionarlo previamente disuelto, se probó su adición en forma de polvo. Cuando se adicionó el sulfato de amonio en forma sólida al 60% p/v (cercano al 100% de saturación) se logró una precipitación del 70% de la actividad enzimática soluble, que al resolubilizarse presentó el 60% de la actividad inicial, es decir que hubo una pérdida del 10% de la actividad inicial al precipitar con esta sal adicionada en forma de polvo (datos no mostrados). En base a los resultados obtenidos en las pruebas de precipitación de la CRL, se decidió emplear acetonitrilo como agente precipitante para la preparación de los CLEAs.

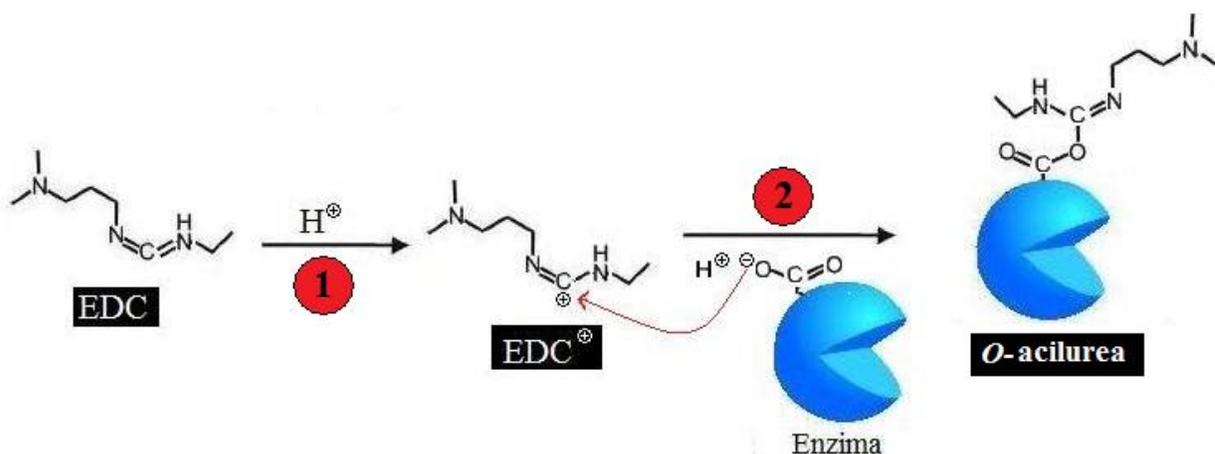


**Figura 40.** Precipitación de la CRL en presencia de sulfato de amonio, *tert*-butanol y acetonitrilo. Todos los ensayos se realizaron en un volumen total de 1 mL que contenía 7.5 mg de preparación comercial en amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7. La precipitación con sulfato de amonio se realizó adicionando dicha sal previamente disuelta a la solución enzimática a insolubilizar.

## 9.2. Desarrollo de la metodología de entrecruzamiento de la CRL con polietileniminas

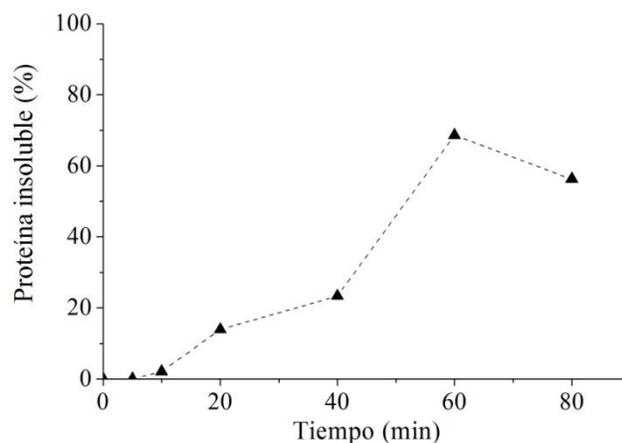
Durante el establecimiento de la metodología de preparación de CLEAs se requirió la identificación de factores clave que repercuten directamente en la formación exitosa de los agregados enzimáticos irreversiblemente entrecruzados. Como primer acercamiento se estudió la reacción propuesta (Fig. 37 en antecedentes) empleando una proteína sin actividad lipolítica que presentara cierto grado de similitud con la enzima modelo de estudio (CRL). La proteína seleccionada fue la albúmina sérica bovina (BSA) que tiene un peso molecular de 66 kDa y que posee 99 residuos de grupos carboxilo presentes a lo largo de toda su estructura (PDB código 107D). El entrecruzamiento de esta proteína modelo permitió la identificación de las variables más importantes que rigen el resultado final de los agregados de proteína entrecruzados bajo la metodología propuesta.

El primer inconveniente de llevar a cabo el entrecruzamiento propuesto en un medio no acuoso (acetonitrilo) fue la baja, casi nula, solubilidad del EDC en dicho solvente. Para poder solubilizarlo fue necesaria la adición de ácido clorhídrico (HCl) en una relación equimolar; lo que permitió la solubilización del EDC en acetonitrilo y además brindó un medio favorable para la formación del carbocatión de EDC que es necesario para la formación de la *O*-acilurea implicada en el primer paso de la reacción (Fig. 41). Lo anterior se explica ya que el carbocatión de EDC<sup>⊕</sup> es susceptible al ataque nucleofílico del átomo de oxígeno desprotonado de los grupos carboxilo ionizados de la proteína para dar la formación de la *O*-acilurea (Nakajima & Ikada, 1995).



**Figura 41.** 1) Formación del carbocatión de EDC. 2) Formación de una *O*-acilurea entre los grupos carboxilo de una enzima y el  $EDC^{\oplus}$ .

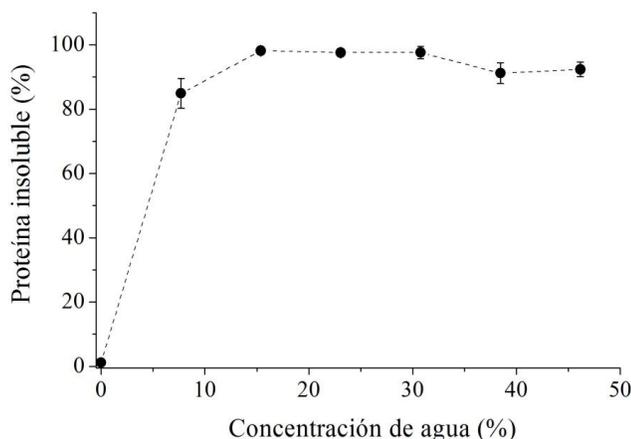
Se encontró que un tiempo de 60 min de incubación fue el óptimo para la obtención de agregados proteínicos entrecruzados (Fig. 42). Por esta razón, la solución de EDC-HCl en acetonitrilo siempre fue preparada 60 min antes de su aplicación.



**Figura 42.** Efecto del tiempo de incubación de la solución de EDC-HCl antes de su aplicación en la reacción de entrecruzamiento de BSA en acetonitrilo. En todos los casos se trabajó con concentraciones de 83 mg/mL de BSA y 120 mM de EDC. El entrecruzamiento se llevó a cabo a 25°C con 8 rpm durante 30 min.

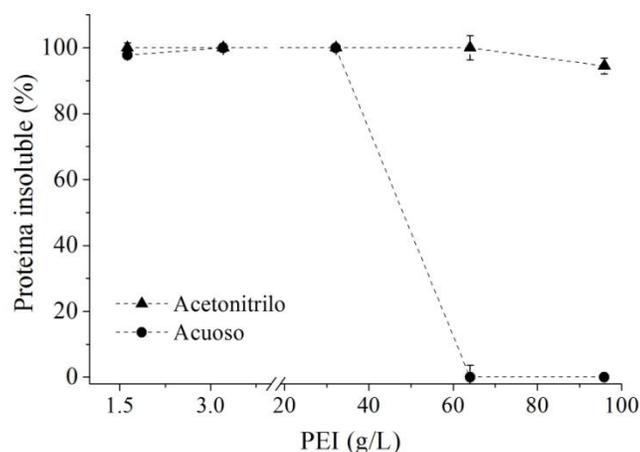
Posteriormente, se comenzó con la adición de la PEI para llevar a cabo el entrecruzamiento de la BSA bajo la metodología propuesta. El primer paso consistió en la determinación de la cantidad mínima de agua que debía estar presente en la reacción para que se llevara a cabo el entrecruzamiento entre la proteína y la PEI. Para ello, se evaluaron concentraciones de 0 a 45% de agua en la reacción (Fig. 43). El resultado mostró que para llevar a cabo el entrecruzamiento bajo la metodología propuesta es necesario al menos un 10% de agua presente en el medio

acetonitrilo/agua, ya que en ausencia de ésta, el proceso no se lleva a cabo en absoluto. El efecto anterior está estrechamente relacionado con el grado de solvatación tanto de los grupos carboxilo presentes en la enzima, así como de los grupos amino de la PEI y del carbocación de EDC, todos involucrados en el proceso.



**Figura 43.** Efecto de la concentración de agua durante el entrecruzamiento de BSA en un sistema acetonitrilo/agua. En todos los casos se empleó una concentración de BSA de 83 mg/mL, EDC-NHS a 124 mM y PEI<sub>1,3</sub> a 3.2 g/L. El entrecruzamiento se llevó a cabo a 25°C, 8 rpm durante 30 min.

Una vez establecida la cantidad de agua mínima para el proceso, se llevó a cabo el entrecruzamiento de BSA probando dos medios de reacción (uno totalmente acuoso y una mezcla acetonitrilo/agua (80:20 v/v)) haciendo variar la concentración de PEI (Fig. 44). El proceso resultó más efectivo cuando se llevó a cabo en acetonitrilo/agua que cuando se hizo en medio acuoso. El comportamiento anterior se explica en términos del pH. Al incrementar la concentración de PEI en medio acuoso (>40 mg/L), el pH aumenta mucho (pH > 9) y la reacción de entrecruzamiento se ve desfavorecida a un pH mayor a 7. Se ha reportado que el consumo de grupos carboxilo por el EDC es dependiente del pH y es óptimo entre pH 3.5 a 5 (Nakajima & Ikada, 1995).



**Figura 44.** Efecto de la concentración de PEI en el entrecruzamiento de BSA en medio acuoso y en acetonitrilo/agua (80:20 v/v). Llevado a cabo como se describe en 8.5.3.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la concentración de EDC y PEI en la efectividad de entrecruzamiento y en el tamaño de los agregados proteínicos entrecruzados en acetonitrilo (de aquí en adelante cuando se hable de un medio de acetonitrilo, éste implicará una mezcla acetonitrilo/agua 80:20 v/v). Para ello, se llevó a cabo un diseño factorial como se describe en la tabla 8.

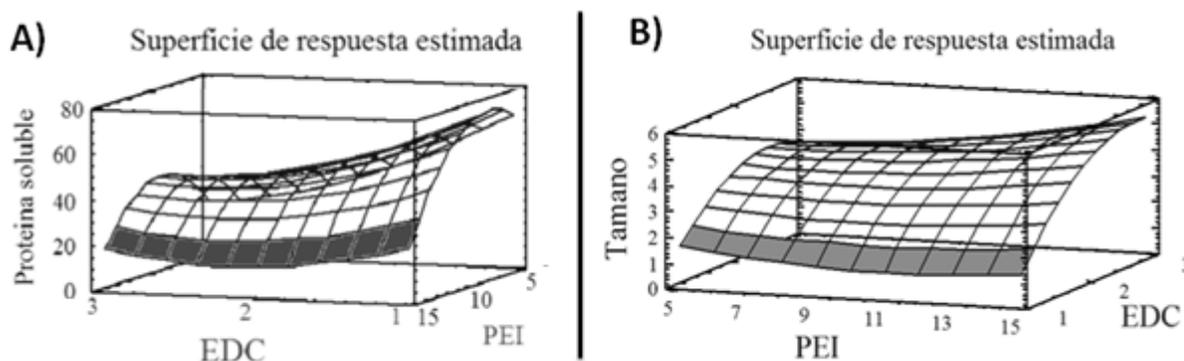
**Tabla 8.** Diseño factorial para la evaluación del efecto de la concentración de EDC y PEI en la efectividad de entrecruzamiento y el tamaño de los agregados proteínicos entrecruzados de BSA.

Factores	Relación EDC/COOH			
		1	2	3
Relación PEI/COOH	15	1-15	2-15	3-15
	10	1-10	2-10	3-10
	5	1-5	2-5	3-5

Todas las unidades experimentales tenían 83 mg/mL de BSA y fueron entrecruzadas en 30 min a 25°C a una velocidad de agitación de 8 rpm. Las relaciones PEI/COOH = 15, 10 y 5 corresponden a 80, 53 y 27 g/L, respectivamente. Las relaciones EDC/COOH = 1, 2 y 3 corresponden a 375, 250 y 125 mM, respectivamente.

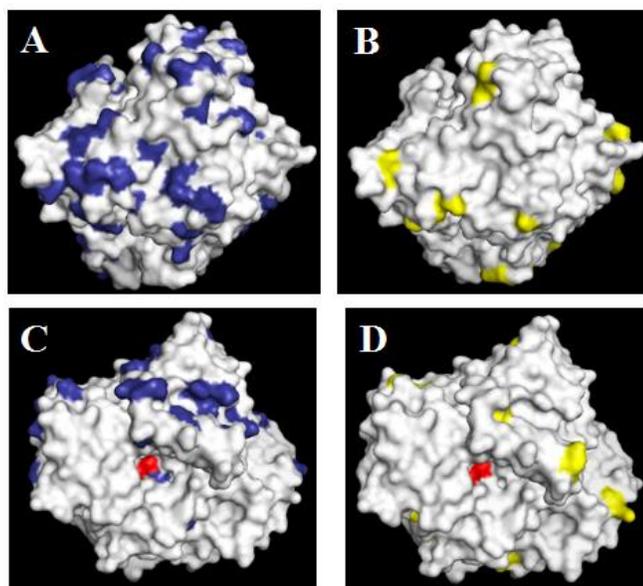
Las variables respuesta a estudiar fueron la efectividad de entrecruzamiento (medida por la proteína soluble remanente después del entrecruzamiento, expresada como porcentaje con respecto a la inicial) y el tamaño de los agregados. La evaluación del tamaño se hizo mediante una escala visual del 1 al 5, en donde 1 correspondía al tamaño de agregados más pequeños (diámetro  $\approx$  0.1 cm) y 5 a tamaños de agregados muy grandes (diámetro  $>$  0.5 cm). Se encontró que la efectividad de entrecruzamiento (máxima a menor cantidad de proteína soluble después del entrecruzamiento) es directamente dependiente tanto de la concentración de PEI como de la de EDC (Fig. 45, A). Sin embargo, a concentraciones altas de EDC (900 mM = relación molar

EDC/COOH = 3) la efectividad de entrecruzamiento es independiente de la concentración de PEI. Por otro lado, el tamaño de los agregados fue dependiente de la concentración de EDC e independiente de la concentración de PEI, resultando en agregados entrecruzados más pequeños al emplear concentraciones de EDC menores (Fig. 45, B). Una vez logrado el entrecruzamiento de BSA en las condiciones de la metodología propuesta, se comenzó a evaluar el entrecruzamiento de la CRL en presencia de BSA.



**Figura 45.** Efecto de la concentración de EDC y PEI durante el entrecruzamiento de BSA en acetonitrilo. Todas las unidades experimentales tenían 83 mg/mL de BSA y se entrecruzaron en 30 min a 25°C y una velocidad de agitación de 8 rpm. A) Superficie de respuesta estimada para la variación en el tamaño de los agregados de proteína entrecruzados en función de la concentración de PEI y EDC. B) Superficie de respuesta estimada para la variación en la proteína soluble después de la preparación de los agregados de proteína entrecruzados en función de la concentración de PEI y EDC.

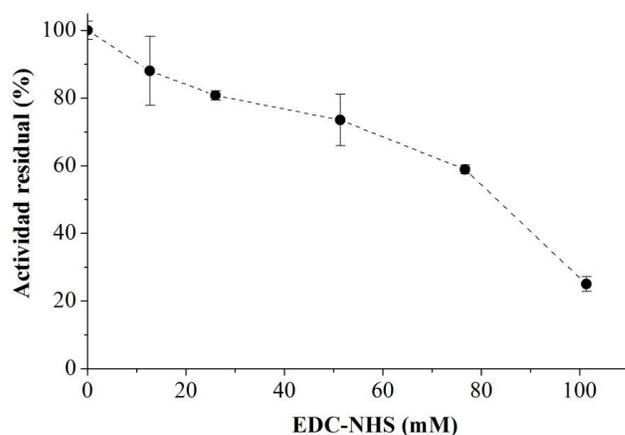
La CRL fue seleccionada como enzima modelo de estudio ya que es una lipasa que se ha empleado para numerosas aplicaciones (Akoh *et al.*, 2004; Dave & Madamwar, 2010; Domínguez De María *et al.*, 2006) y que cuenta con una buena distribución de grupos carboxilo a lo largo de su estructura (que son 2.6 veces más abundantes que sus residuos de lisina) (Fig. 46). Además de que se han preparado exitosamente CLEAs de la CRL (CRL-CLEAs) mediante la metodología tradicional de entrecruzamiento con glutaraldehído (Kartal *et al.*, 2011; López-Serrano *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2006). Se ha reportado que esta enzima presenta 7 isoformas que varían en grado de glicosilación y punto isoeléctrico (Ferrer *et al.*, 2001). Dichas isoformas también pueden presentar diferencias en sus perfiles catalíticos (Domínguez De María *et al.*, 2006; López *et al.*, 2004). Por este motivo, en este trabajo se empleó la preparación comercial de la CRL TVII marca Sigma-Aldrich que contiene sólo a las isoformas Lip1 (89%) (PDB 1LPS) y Lip3 (11%) (PDB 1CLE) (López *et al.*, 2004).



**Figura 46.** Distribución de residuos de lisinas (amarillo) y los ácidos aspártico (azul) y glutámico (azul) en la superficie de la CRL. A y B) Lado contrario al sitio catalítico. C y D) Lado del sitio catalítico abierto. En rojo, la triada catalítica. La estructura 3D de la CRL fue obtenida del Protein Data Bank con el código 1LPS.

Como primer acercamiento se realizó el entrecruzamiento de la CRL (10 mg de preparación comercial en polvo con alrededor de 20 mg proteína/g preparación) en presencia de BSA (5 mg) empleando las mejores condiciones de reacción obtenidas anteriormente al entrecruzar exclusivamente BSA (80 g/L de PEI y 125 mM de EDC-NHS). Los resultados mostraron que, bajo estas condiciones, se logró entrecruzar tan sólo el 5.7% de la actividad enzimática presente ( $94.3\% \pm 1.2\%$  de actividad residual en el sobrenadante después del entrecruzamiento). Sin embargo, la actividad recuperada en forma de CLEAs fue del  $6.3\% \pm 1.7\%$ , lo que nos permitió concluir que bajo estas condiciones de entrecruzamiento el daño causado a la enzima fue nulo, incluso se obtuvo una ligera activación del 10% (datos no mostrados). No obstante, el sistema de reacción para el entrecruzamiento presentaba una desventaja muy grande ya que debido al pequeño volumen de reacción empleado (120  $\mu$ L) la mezcla de los reactivos era muy heterogénea e incluso había partes de la CRL y la BSA en polvo que no se lograban poner en contacto con el solvente. El bajo nivel de proteína entrecruzada fue atribuido a la deficiencia del mezclado en el medio de reacción. Para mejorar los resultados anteriores, se aumentó el volumen de reacción hasta lograr obtener un sistema con un mezclado homogéneo (300  $\mu$ L). Además, con el objetivo de lograr un mayor grado de entrecruzamiento, se decidió preparar los CRL-CLEAs a diferentes concentraciones de EDC-NHS y PEI. Debido a la

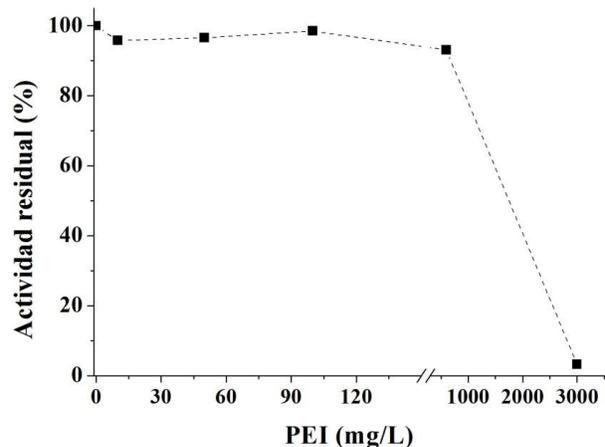
falta de información en la literatura en una primera etapa se determinó el efecto de la concentración de EDC-NHS y de PEI independientemente. (Fig. 47 y 48).



**Figura 47.** Efecto desnaturalizante del EDC-NHS sobre la CRL después de 1 h de incubación a 25°C.

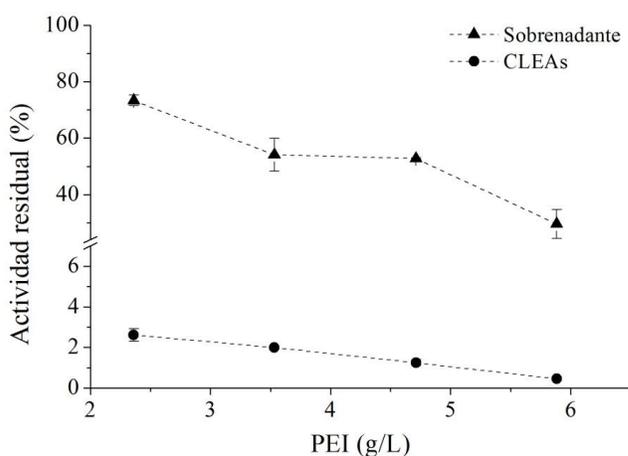
El estudio de la concentración de EDC-NHS sobre la actividad residual (Fig. 51) demostró que con una concentración 80 mM de EDC-NHS se recupera alrededor del 60% de actividad residual. A concentraciones mayores de EDC-NHS la actividad residual de la CRL libre se ve afectada en más de un 50%. Por otro lado, concentraciones de PEI<sub>1,3</sub> menores de 1 g/L permiten recuperar más del 90% de la actividad enzimática. Con 3 g/L de PEI<sub>1,3</sub> la enzima libre se ve totalmente inactivada.

**Figura 48.** Efecto desnaturalizante del PEI sobre la CRL después de 1 h de incubación a 25°C.



Del mismo modo, para lograr aumentar la cantidad de enzima entrecruzada, se disminuyó la cantidad de BSA usada anteriormente (de 5 a 1 mg) y se trabajó con un volumen de reacción de 300  $\mu$ L para llevar a cabo la evaluación del efecto de la concentración de PEI<sub>1,3</sub> en el entrecruzamiento de CRL-CLEAs empleando una concentración de EDC-NHS de 5 mM (que

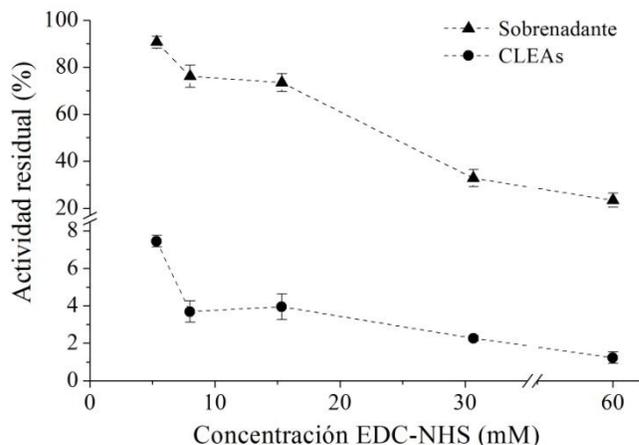
corresponde a una relación molar 1:1 entre el EDC-NHS/grupos carboxilo de la CRL + BSA) (Fig. 49). Como se esperaba, a mayor concentración de PEI<sub>1,3</sub> se logró tener menor actividad residual en el sobrenadante (es decir mayor entrecruzamiento), logrando un máximo de enzima entrecruzada del 70% al emplear la concentración de PEI más alta. Sin embargo, la actividad recuperada en forma de CLEAs en ninguno de los casos fue superior al 3%. En los siguientes ensayos, se decidió fijar la concentración de PEI<sub>1,3</sub> alrededor de 3.5 g/L, ya que en estas condiciones se logró el 46% de entrecruzamiento de la enzima con una actividad residual en los CLEAs mayor que en 4.7 y 5.9 g/L de PEI<sub>1,3</sub>. Por otro lado, a pesar de que anteriormente se había determinado que la máxima concentración de PEI a trabajar sería de 1g/L (Fig. 48), a concentraciones menores a 2 g/L no se observó formación de CLEAs (datos no mostrados).



**Figura 49.** Efecto de la concentración de PEI<sub>1,3</sub> en el entrecruzamiento de los CRL-CLEAs en acetonitrilo. En todos los casos se emplearon 10 mg de preparación comercial de la CRL + 1 mg de BSA, una concentración de 5 mM de EDC-NHS en un volumen de reacción de 0.3 mL. El entrecruzamiento se llevó a cabo a 25°C, 1000 rpm por 30 min.

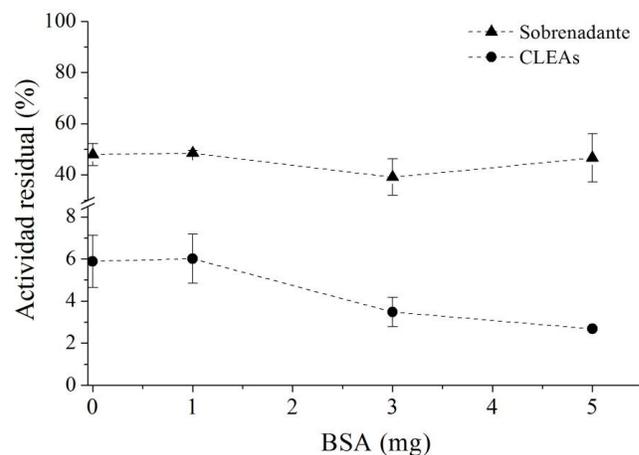
A continuación, se evaluó el efecto de la concentración de EDC-NHS en el entrecruzamiento de los CRL-CLEAs en acetonitrilo (Fig. 50). Del mismo modo que con el PEI<sub>1,3</sub>, al aumentar la concentración de EDC-NHS se encontró menor actividad residual en el sobrenadante, logrando entrecruzar hasta un 77% de la enzima a 60 mM de EDC-NHS. Sin embargo, nuevamente, en las condiciones de mayor entrecruzamiento se recuperó la menor actividad en forma de CLEAs (1.2%). La mayor actividad entrecruzada se obtuvo al emplear concentraciones de EDC-NHS de 5 mM (7.5% de actividad residual), no obstante en estas condiciones el entrecruzamiento de la enzima fue menor del 10% ya que se recuperó el 90.7% de actividad residual en el sobrenadante después del tratamiento. Por este motivo, se decidió usar una concentración de EDC-NHS entre 25 y 30 mM ya que en estas condiciones se logró entrecruzar mayor cantidad de actividad enzimática (67%) en comparación con las menores

concentraciones probadas. Además, los CRL-CLEAs preparados a 30 mM resultaron más activos en comparación que los preparados a 60 mM.



**Figura 50.** Efecto de la concentración de EDC-NHS en el entrecruzamiento de los CRL-CLEAs con PEI<sub>1,3</sub> en acetonitrilo. En todos los casos se emplearon 10 mg de preparación comercial de la CRL + 1 mg de BSA, una concentración de PEI<sub>1,3</sub> de 3 g/L en un volumen de reacción de 0.3 mL. El entrecruzamiento se llevó a cabo a 25°C, 1000 rpm por 30 min.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la cantidad de BSA adicionada en el entrecruzamiento de los CRL-CLEAs en acetonitrilo (Fig. 51). La cantidad de enzima entrecruzada no presentó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en función de la cantidad de BSA; en todos los casos se insolubilizó alrededor del 50% de la enzima. Sin embargo, la actividad recuperada en forma de CLEAs fue mayor al disminuir la cantidad de BSA adicionada. Con la adición de 1 mg de BSA se logró recuperar el 6% de actividad residual en forma de CLEAs, mismo resultado que se obtuvo sin adicionar BSA.

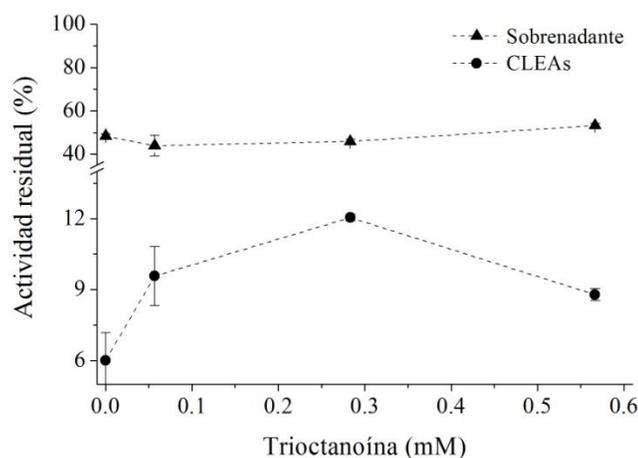


**Figura 51.** Efecto de la concentración de BSA en el entrecruzamiento de los CRL-CLEAs con PEI<sub>1,3</sub> en acetonitrilo. En todos los casos se emplearon 10 mg de preparación comercial de la CRL, una concentración de PEI<sub>1,3</sub> de 3 g/L y EDC-NHS de 26 mM en un volumen de reacción de 0.3 mL. El entrecruzamiento se llevó a cabo a 25°C, 1000 rpm por 30 min.

La baja actividad recuperada en forma de CLEAs en los ensayos anteriores puede deberse a que el entrecruzamiento de los grupos carboxilo de la CRL provoca su inactivación

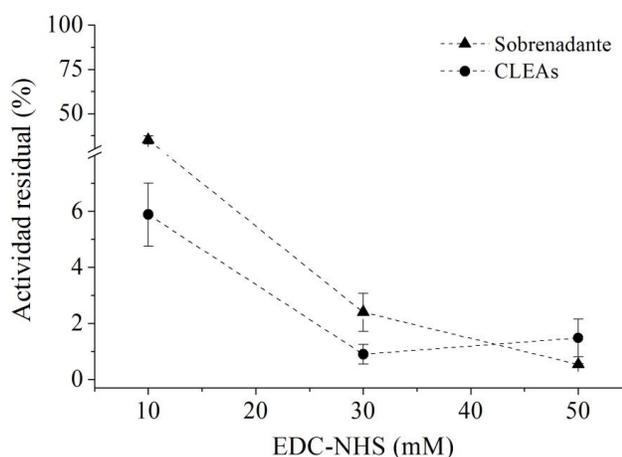
irreversible. Así mismo también puede ser atribuida a una conformación muy poco activa de la enzima al estar insoluble en acetonitrilo, por lo que al entrecruzar la enzima bajo estas condiciones la actividad recuperada era muy baja. Para poder determinar cuál de estas posibles razones explicaba mejor la baja actividad recuperada, primero se procedió a proteger el sitio catalítico de la CRL durante el entrecruzamiento. Dicho proceso se llevó a cabo adicionando un sustrato de la lipasa (la trioctanoína) al medio de reacción. Este tipo de estrategias ha sido ampliamente empleado para la preservación de la conformación activa del sitio catalítico durante la inmovilización de enzimas (Fishman & Cogan, 2003; Foresti *et al.*, 2005) ya que el complejo enzima-sustrato permite inmovilizar a la enzima en una conformación activa, con la ventaja de que el sustrato puede retirarse al final del proceso mediante lavados.

Con la adición de trioctanoína a una concentración de 0.28 mM, se logró recuperar CRL-CLEAs con el doble de actividad que en ausencia de dicho sustrato (Fig. 52). Sin embargo, la cantidad de enzima entrecruzada en estas condiciones fue del 55%, y sólo se logró recuperar el 22% de dicha actividad (que corresponde al 12% de actividad residual cuando se compara con la actividad inicial total). Los valores obtenidos en el presente trabajo, son comparables a otros reportes sobre CRL-CLEAs entrecruzados con glutaraldehído empleando solventes orgánicos como agentes precipitantes, en donde reportan un máximo de 26% de actividad residual recuperada en forma de CLEAs después de la optimización del proceso (Kartal *et al.*, 2011).



**Figura 52.** Efecto de la concentración de trioctanoína en el entrecruzamiento de los CRL-CLEAs con PEI<sub>1,3</sub> en acetonitrilo. En todos los casos se emplearon 10 mg de preparación comercial de la CRL, 1 mg de BSA, una concentración de PEI<sub>1,3</sub> de 3 g/L y EDC-NHS de 26 mM en un volumen de reacción de 0.3 mL. El entrecruzamiento se llevó a cabo a 25°C, 1000 rpm por 30 min.

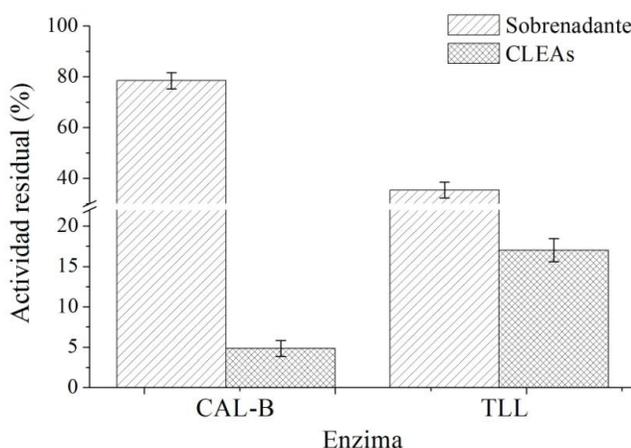
Por otro lado, se ha reportado que el sulfato de amonio permite la preparación de CRL-CLEAs entrecruzados con GA que presentan el 85% de actividad residual (Yu *et al.*, 2006). Por lo tanto, se decidió probar la preparación de CRL-CLEAs empleando dicha sal como agente precipitante a diferentes concentraciones de EDC-NHS (Fig. 53). Los resultados obtenidos mostraron CLEAs con una máxima actividad residual recuperada del 6% al emplear 10 mM de EDC-NHS, a pesar de que bajo estas condiciones se logró entrecruzar más del 50% de la actividad. Con estos resultados, pudimos concluir que la baja actividad recuperada al preparar carboxi-CLEAs de la CRL puede atribuirse a la desestabilización de la conformación activa de la enzima debida al entrecruzamiento de sus grupos carboxilo.



**Figura 53.** Efecto de la concentración de EDC-NHS en el entrecruzamiento de los CRL-CLEAs con PEI<sub>1,3</sub> en medio acuoso empleando como agente precipitante 64% p/v de sulfato de amonio. En todos los casos se empleó una concentración de PEI<sub>1,3</sub> de 0.1 g/L, 0.3 mM de trioctanoína y un volumen de reacción de 1 mL. El entrecruzamiento se llevó a cabo a 25°C, 1000 rpm por 30 min.

Para comprobar si el comportamiento anterior era atribuible a otras lipasas o sólo a la CRL se decidió preparar carboxi-CLEAs de otras lipasas comerciales (Fig. 54). Las lipasas comerciales probadas fueron la CALB y la TLL. Con estas enzimas, la mayor actividad residual recuperada en forma de CLEAs fue la obtenida para los CLEAs de la TLL (TLL-CLEAs) que expresaron el 17% de la actividad inicial, que corresponde únicamente al 26% de la actividad inmovilizada (35% actividad residual en el sobrenadante). En el caso de los CLEAs de la CALB (CALB-CLEAs), se logró recuperar sólo el 5% de la actividad inicial en forma de CLEAs, que corresponde al 23% de la actividad inmovilizada (78% de actividad residual en el sobrenadante). Con estos resultados se llegó a la conclusión de que las lipasas inmovilizadas en forma de

CLEAs a través de sus grupos carboxilo logran expresar alrededor del 22-26% de la actividad inmovilizada de esta manera (Tabla 9).



**Figura 54.** CLEAs de lipasas entrecruzadas con PEI<sub>1,3</sub> en acetonitrilo. En ambos casos se empleó el precipitado de 0.36 mL de preparación comercial de la CALB ó la TLL, una concentración de PEI<sub>1,3</sub> de 0.52 g/L y EDC-NHS de 448 mM en un volumen de reacción de 0.3 mL. El entrecruzamiento se llevó a cabo a 25°C, 1000 rpm por 30 min.

**Tabla 9.** Inmovilización de lipasas mediante la preparación de carboxi-CLEAs entrecruzados con PEI<sub>1,3</sub> en acetonitrilo.

Enzima	A <sub>i</sub> <sup>1</sup> (%)	A <sub>e</sub> <sup>2</sup> (%)	A <sub>ei</sub> <sup>3</sup> (%)
CRL	55	12	22
CALB	22	5	23
TLL	65	17	26

<sup>1</sup>A<sub>i</sub>: actividad inmovilizada, definida por  $A_i = (\text{actividad inicial} - \text{actividad en el sobrenadante}) / \text{actividad inicial}$ . <sup>2</sup>A<sub>e</sub>: actividad expresada en forma de CLEAs, definida por  $A_e = (\text{actividad en los CLEAs} / \text{actividad inicial})$ . <sup>3</sup>A<sub>ei</sub>: actividad expresada inmovilizada definida por  $A_{ei} = (A_e / A_i)$ .

En comparación con lo reportado en la literatura, los CALB-CLEAs entrecruzados con glutaraldehído pueden recuperar más del 100% de su actividad inicial cuando se preparan empleando agentes precipitantes como el *tert*-butanol, sulfato de amonio y dimetil éter; sin embargo, para llegar a estos resultados fue necesario llevar a cabo la optimización de las condiciones de preparación mediante el empleo de diseños experimentales de superficie de respuesta (Cruz *et al.*, 2012). Por otro lado, los TLL-CLEAs entrecruzados con GA han recuperado hasta un 14% de la actividad inicial cuando se prepararon con 1,2-dimetoxietano como agente precipitante, y hasta un 81% cuando fueron preparados en sulfato de amonio (Gupta

*et al.*, 2009). De manera que, en comparación con los trabajos reportados de los CLEAs preparados con GA (amino-CLEAs), el entrecruzamiento de los grupos amino de las lipasas resulta menos dañino que el de los grupos carboxilo. Probablemente este efecto se puede atribuir por un lado a que las lipasas presentan una triada catalítica compuesta por un residuo de ácido aspártico o glutámico que al verse comprometido en el entrecruzamiento inactiva a la enzima. Por otro lado, en las lipasas, los grupos carboxilo son más abundantes que los grupos amino, por lo que el grado de modificación estructural al entrecruzar los primeros es mayor que al hacerlo con los segundos, produciendo cambios más marcados. Esto también se puede observar al comparar la actividad residual de los CALB-CLEAs entrecruzados exclusivamente con GA (100% de actividad residual (Cruz *et al.*, 2012)) en comparación con los entrecruzados con GA después de la aminación de los grupos carboxilo con etilendiamina en donde se llevó a cabo el entrecruzamiento tanto de grupos amino como de carboxilos (28% de actividad residual (Galvis *et al.*, 2012)).

### **9.2.1. Protocolo general de inmovilización de enzimas en forma de CLEAs por entrecruzamiento de sus grupos carboxilo con polietileniminas**

Los estudios realizados permitieron establecer una metodología general para la preparación de CLEAs bajo la metodología desarrollada (Velasco-Lozano *et al.*, 2014). Dicho protocolo se describe en dos etapas: 1) la precipitación ó suspensión de las proteínas, y 2) el entrecruzamiento. A continuación se detalla el protocolo:

#### **1) Precipitación**

*Con solventes orgánicos:* Colocar 1 mL de la preparación enzimática en un tubo con fondo cónico de 15 mL y agregar lentamente 8 a 9 volúmenes del solvente a 4°C. De preferencia, dicha preparación enzimática debe contener al menos 10 mg de proteína, en caso de que no los hubiera se puede adicionar albúmina sérica bovina (BSA). Corroborar que bajo las condiciones trabajadas se precipita más del 90 % de la proteína y no hay aparición de dos fases inmiscibles.

*Con sulfato de amonio:* Colocar 1 mL de la preparación enzimática en un tubo con fondo cónico de 15 mL y agregar 9 mL de buffer MES 0.1 M pH 5. De preferencia, dicha preparación enzimática debe contener al menos 10 mg de proteína, en caso de que no los hubiera se puede adicionar BSA. Posteriormente adicionar sulfato de amonio sólido hasta llegar al 60 % de saturación. Corroborar que bajo las condiciones trabajadas se precipita más del 90 % de la proteína y no hay aparición de dos fases inmiscibles.

*Suspensión:* en caso de partir de una preparación enzimática en polvo, colocar de 100 – 200 mg de la preparación enzimática en polvo en un tubo de fondo cónico de 15 mL. Adicionar 10 mL de solvente orgánico. En caso de tratarse de una lipasa, se recomienda la adición de trioctanoína disuelta en el solvente orgánico (concentración final de 0.2 mg/mL) para proteger el sitio catalítico.

## **2) Entrecruzamiento**

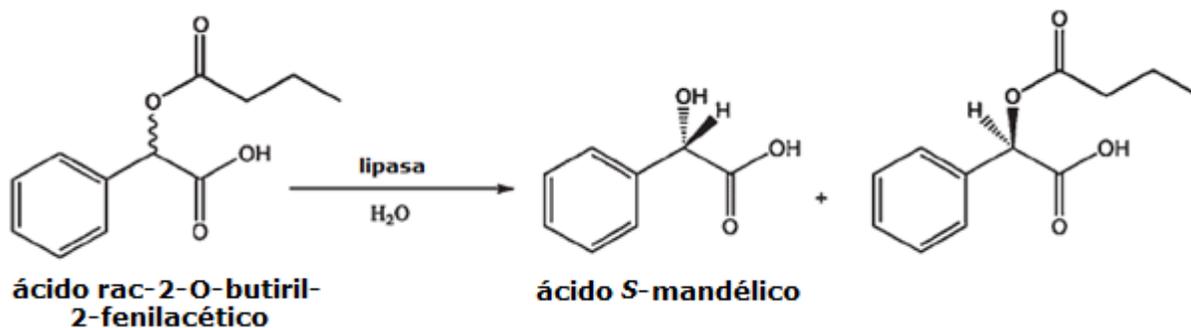
Una vez realizado el paso de precipitación, adicionar 300  $\mu$ L de una solución 10 a 100 mM de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) en buffer MES 100 mM pH 5 (a una concentración final de 10 a 100 mM según el grado de entrecruzamiento deseado) y mantener bajo agitación 5 min a 1000 rpm y 25°C. Posteriormente adicionar 300  $\mu$ L de una solución de N-hidroxisuccinimida (NHS) (a la misma concentración de EDC empleada) y mantener bajo agitación 5 min a 1000 rpm y 25°C. Después agregar 300  $\mu$ L de una solución acuosa de polietilenimina (PEI) (a una concentración final de 0.5 a 5 g/L, según el caso). Mantener esta mezcla bajo agitación a 1000 rpm de 30 a 60 min a 25°C. Terminado el tiempo, centrifugar a 10000 rpm por 5 min a 4°C y descartar el sobrenadante. Para regenerar las posibles tirosinas modificadas por acción del EDC, resuspender el precipitado (CLEAs) en 10 mL de una solución de hidroxilamina disuelta en un buffer fosfatos-NaCl pH 7 (0.1 y 0.5 M, respectivamente, la concentración de hidroxilamina siempre 5 veces mayor a la concentración de EDC empleada) y dejar reaccionando por 1 h a 25°C y 1000 rpm. Terminado el tratamiento, volver a centrifugar los CLEAs a 10000 rpm por 5 min a 4°C y descartar el sobrenadante. A continuación proceder a lavar los CLEAs al menos 3 veces más (10 mL por lavado) con buffer fosfatos-NaCl pH 7 para remover el EDC, NHS, PEI y la hidroxilamina remanentes. Finalmente suspender en un buffer de fosfatos 25 mM pH 7 y almacenar a -20°C.

Después de haber establecido el protocolo de preparación de CLEAs bajo la metodología propuesta, se continuó con la evaluación del cambio de sus propiedades catalíticas en función de las condiciones de preparación.

### **9.3. Evaluación de las propiedades catalíticas de CRL-CLEAs bajo diferentes condiciones de preparación**

Una vez establecidas las condiciones de entrecruzamiento para la preparación de carboxi-CLEAs de la CRL se procedió a evaluar sus propiedades catalíticas, así como la modificación de

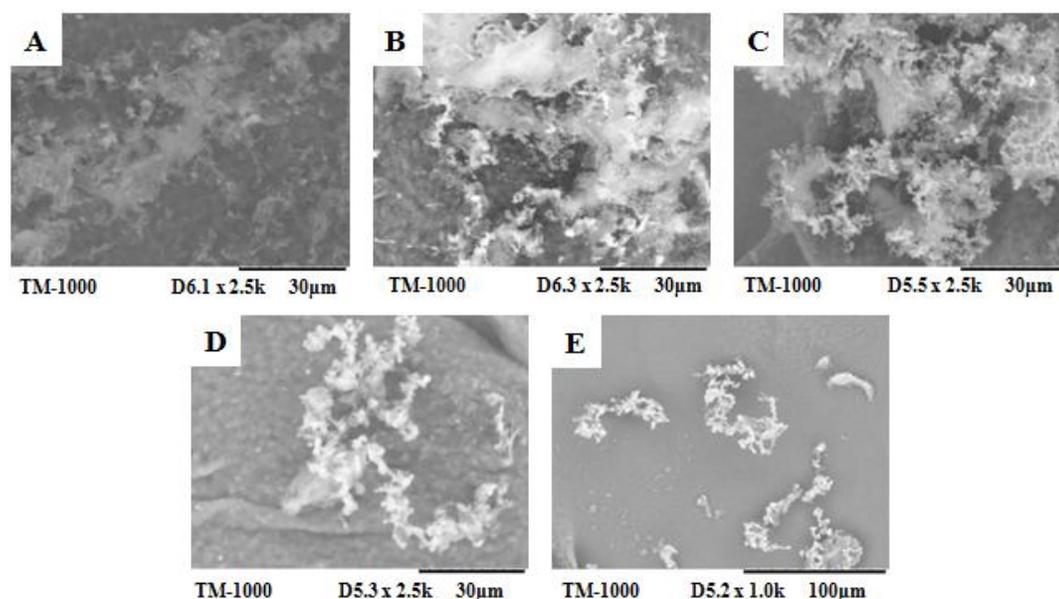
éstas bajo diferentes condiciones de preparación. Para ello se evaluaron tres variables: 1) el grado de entrecruzamiento, 2) la adición de BSA como mejorador del entrecruzamiento, y 3) la longitud de cadena de la PEI. Las variables de respuesta medidas fueron: tamaño, morfología, actividad específica, porcentaje de actividad recuperada en forma de CLEA, termoestabilidad a 50°C y enantioselectividad. Como modelo de estudio, el ácido 2-*O*-butiril-2-fenilacético (BFA) se empleó como sustrato quiral cuyo producto de hidrólisis, el ácido mandélico (Fig. 55) es un importante precursor en la producción de varios antibióticos (Tang *et al.*, 2009; Xue *et al.*, 2011), agentes antitumorales (Grover *et al.*, 2000) y alcoholes quirales (Whitesell & Reynolds, 1983). La enantioselectividad de los CRL-CLEAs se comparó con la obtenida con el derivado de la CRL inmovilizado en BrCN-agarosa ( $E_{(S)}=9.5$ ), ya que sus propiedades son muy semejantes a las de la enzima en su forma libre.



**Figura 55.** Hidrólisis de la mezcla racémica del ácido 2-*O*-butiril-2-fenilacético catalizada por lipasas (Fernández-Lorente *et al.*, 2005).

### 9.3.1. Grado de entrecruzamiento

La variación en el grado de entrecruzamiento de los amino-CLEAs ha demostrado ser un factor importante en el resultado final de su tamaño, actividad, estabilidad y selectividad (Talekar *et al.*, 2013). En este caso particular, la variación de la concentración de EDC-NHS regula el grado de activación de los grupos carboxilo de la enzima, permitiendo modificar el grado de entrecruzamiento de los carboxi-CLEAs. Los CLEAs así preparados presentaron una morfología de una red granular, que disminuía en tamaño, espaciamento y abundancia de los gránulos conforme lo hacía la concentración de EDC-NHS (Fig. 56).



**Figura 56.** CLEAs con diferente tamaño de acuerdo con la concentración empleada de EDC-NHS. A) 13 mM, B) 20 mM, C) 28 mM, D) 35 mM y E) 40 mM.

Por otro lado, con el aumento de la concentración de EDC-NHS los CLEAs presentaron menor actividad específica y menor actividad recuperada (Tabla 10). Este resultado puede atribuirse a un mayor grado de rigidificación de la estructura de la enzima a mayor grado de entrecruzamiento, resultando en la pérdida de la flexibilidad enzimática que es crucial para la actividad. Sin embargo, a concentraciones de carbodiimida muy bajas ( $< 13$  mM) no se observó la formación de CLEAs. Esta misma tendencia ha sido reportada tanto para los GA-CLEAs (Kartal *et al.*, 2011; Majumder *et al.*, 2008) como para aquellos agregados entrecruzados con otros agentes como las *p*-benzoquinonas (Wang *et al.*, 2011a). Estos resultados muestran que durante el proceso de optimización de la preparación de los CLEAs, se requiere de un balance entre el grado de entrecruzamiento y la actividad específica.

**Tabla 10.** Efecto de la concentración de EDC-NHS en las propiedades de los CLEAs

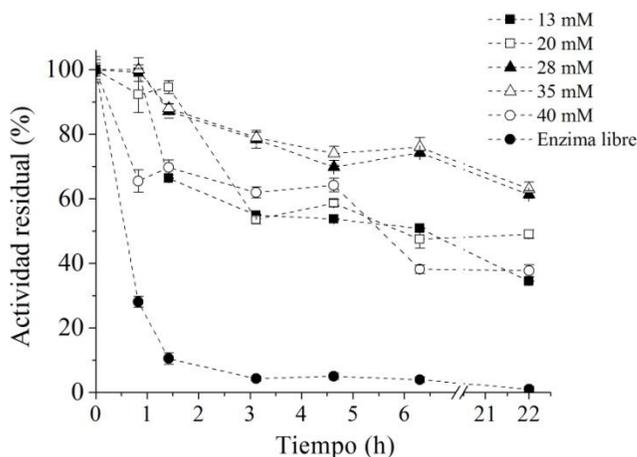
EDC-NHS (mM)	Diámetro del CLEA <sup>1</sup> (µm)	Actividad específica pNPB <sup>2</sup> (U/mg)	Actividad recuperada <sup>3</sup> (%)	Actividad específica BFA <sup>4</sup> (U/mg)	<i>ee</i> (%)	<i>E</i> <sup>5</sup> ( <i>S</i> )
13	20-80	75 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	5.8 <sup>a</sup>	82 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>
20	20-100	71 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	4.5 <sup>b</sup>	86 <sup>b</sup>	13 <sup>a,b</sup>
28	50-100	33 <sup>b</sup>	12 <sup>b</sup>	3.1 <sup>c</sup>	91 <sup>c</sup>	21 <sup>c</sup>
35	50-150	18 <sup>c</sup>	11 <sup>b,c</sup>	2.0 <sup>c,d</sup>	86 <sup>b</sup>	13 <sup>a,b</sup>
40	50-150	13 <sup>c</sup>	9 <sup>c</sup>	1.1 <sup>d</sup>	88 <sup>b,c</sup>	15 <sup>b</sup>

Todos los CLEAs fueron preparados con 30 mg/mL [enzima], 3 g/L [PEI<sub>1,3</sub>] y 10 mg de BSA. <sup>1</sup>Los diámetros de los CLEAs fueron estimados de las imágenes de SEM. <sup>2</sup>Las condiciones de reacción fueron pNPB 0.5 mM en amortiguador de fosfatos (25 mM pH 7.0) a 25°C. <sup>3</sup>La actividad recuperada fue estimada de la actividad de los CLEAs con pNPB como sustrato. <sup>4</sup>Las condiciones de reacción fueron BFA 5 mM en amortiguador de acetato (10 mM, pH 5) a 25°C. <sup>5</sup>*E* fue calculado del coeficiente de las tasas de reacción de (*S*)-ácido mandélico/(*R*)-ácido mandélico. <sup>a,b,c,d,e</sup>Los valores con distintas letras son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ). Los valores presentados son el promedio de tres ensayos independientes.

En cuanto a su enantioselectividad, los CLEAs presentaron una concentración óptima de EDC-NHS (28 mM) en donde se obtuvo la mayor selectividad ( $ee = 91\%$  con  $E_{(S)} = 21$ ) (Tabla 10). A concentraciones mayores, tanto la actividad específica sobre BFA como la enantioselectividad de los CLEAs se vieron disminuidas. Dicho fenómeno muestra el compromiso que existe entre la actividad específica y la enantioselectividad. Estos resultados concuerdan fuertemente con los reportados para los CLEAs de la PCL entrecruzados con GA (Majumder *et al.*, 2008).

Al evaluar la termoestabilidad de las diferentes preparaciones, en todos los casos se encontró una estabilidad mejorada en comparación con la enzima libre (Fig. 57). Los CLEA más estables retuvieron 60% de su actividad inicial después de 22 h de incubación a 50°C a un pH 7. La termoestabilidad mejorada a un mayor grado de entrecruzamiento está relacionada con una mayor rigidez en la estructura tridimensional de la enzima. Sin embargo, a la concentración más alta de EDC-NHS (40 mM) no se observó un aumento en la termoestabilidad en comparación a la obtenida a 28 y 35 mM. Dicho resultado podría atribuirse a que un mayor grado de modificación química de la enzima estaría ocasionando una mayor distorsión estructural con pérdida de las interacciones que proporcionan estabilidad térmica a la enzima, ya que la estabilidad enzimática depende de la flexibilidad y rigidez de su sitio catalítico. Diversos tipos de

interacciones (hidrofóbicas, cadena principal-puentes de hidrógeno de la cadena principal, cadena lateral-puentes de hidrógeno de la cadena principal, cadena lateral-puentes de hidrógeno de la cadena lateral, grupos aromáticos-grupos aromáticos e interacciones iónicas) están implicadas en la estabilidad térmica de algunas lipasas (Xie *et al.*, 2014). Así mismo, otros reportes han descrito la relación que existe entre la mejora de la estabilidad térmica de los GA-CLEAs y su grado de entrecruzamiento (Majumder *et al.*, 2008).

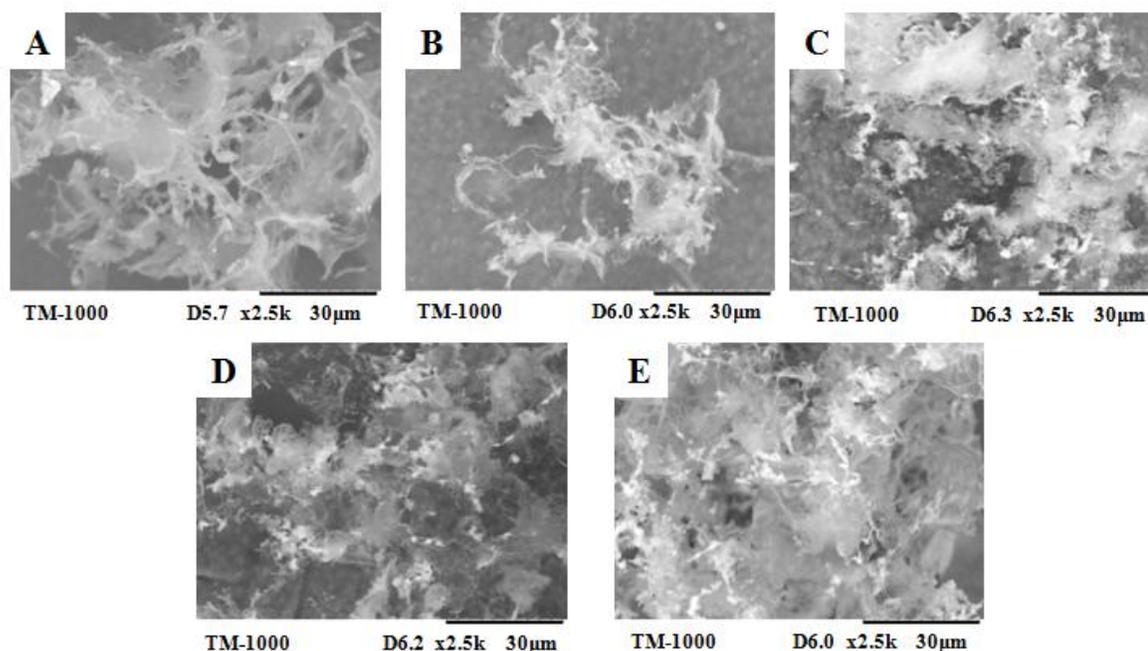


**Figura 57.** Termoestabilidad de la CRL y de CRL-CLEAs preparadas a diferente concentración de EDC-NHS. Los ensayos fueron llevados a cabo a 50°C y pH 7. Los símbolos representan la media de dos ensayos independientes  $\pm$  desviación estándar.

Por su mayor termoestabilidad y enantioselectividad, se seleccionó una concentración de 28 mM de EDC para continuar con los siguientes estudios en donde se evaluaron la adición de BSA (ver sección 9.3.2) y el tamaño del agente de entrecruzamiento (ver sección 9.3.3).

### 9.3.2. Adición de BSA como mejorador del entrecruzamiento

En este apartado se evaluó el efecto de la adición de BSA en las propiedades catalíticas de los CRL-CLEAs. Las diversas ventajas sobre el empleo de BSA durante la preparación de CLEAs se encuentran bien documentadas (Cruz *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2010; Shah *et al.*, 2006). Para todos los casos se empleó una concentración de 28 mM de EDC-NHS debido a los resultados obtenidos previamente (9.3.1). Diferentes cantidades de BSA añadida mostraron no tener efecto en la morfología de los CLEAs (Fig. 58), mientras que tuvieron un fuerte impacto en su tamaño y propiedades catalíticas (Tabla 11).



**Figura 58.** CLEAs de tamaño diferente conforme a la cantidad de BSA adicionada. A) 0 mg, B) 5 mg, C) 10 mg, D) 30 mg y E) 50 mg.

En cuanto a su tamaño y actividad específica, los CLEAs presentaron menor diámetro y mayor actividad al ser preparados con menor cantidad de BSA. Así mismo, al adicionar pequeñas cantidades de BSA (<10 mg), se tuvo un marcado efecto positivo en la actividad y enantioselectividad de los CLEAs. La adición de BSA durante la preparación de GA-CLEAs puede resultar en un aumento (García-García *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2006) o en una disminución (Cabana *et al.*, 2007; Matijošyte *et al.*, 2010) de su actividad catalítica. En nuestro caso, la adición de BSA no produjo ningún efecto positivo en la actividad específica de los CLEAs, resultado también reportado para los CRL-CLEAs entrecruzados con GA (Kartal *et al.*, 2011).

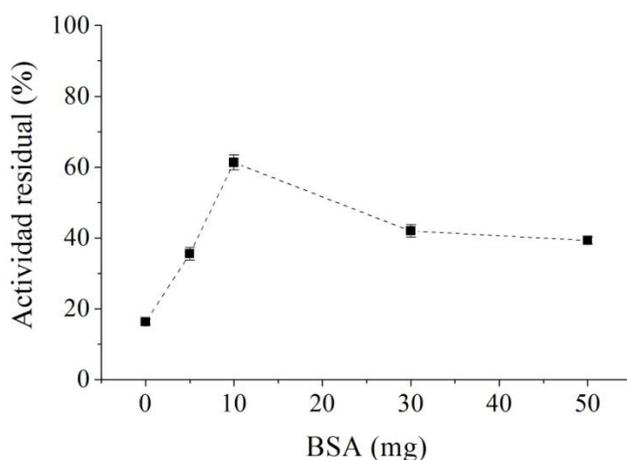
**Tabla 11.** Efecto de la cantidad de BSA adicionada en las propiedades de los CLEAs.

BSA (mg)	Diámetro del CLEA <sup>1</sup> (µm)	Actividad específica pNPB <sup>2</sup> (U/mg)	Actividad recuperada <sup>3</sup> (%)	Actividad específica BFA <sup>4</sup> (U/mg)	ee (%)	E <sup>5</sup> (S)
0	20-100	36 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>	3.1 <sup>a</sup>	92 <sup>a</sup>	24 <sup>a</sup>
5	50-100	32 <sup>b</sup>	12 <sup>a</sup>	4.5 <sup>b</sup>	92 <sup>a</sup>	23 <sup>a</sup>
10	50-100	33 <sup>b</sup>	12 <sup>a</sup>	3.0 <sup>a</sup>	91 <sup>a,b</sup>	21 <sup>a</sup>
30	100-200	11 <sup>c</sup>	9 <sup>b</sup>	1.2 <sup>c</sup>	87 <sup>b,c</sup>	15 <sup>b</sup>
50	150-250	3 <sup>d</sup>	9 <sup>b</sup>	0.2 <sup>d</sup>	84 <sup>c</sup>	11 <sup>b</sup>

Todos los CLEAs fueron preparados con 30 mg/mL [enzima], 3 g/L [PEI<sub>1.3</sub>] y 28 mM [EDC-NHS]. <sup>1</sup>Los diámetros de los CLEAs fueron estimados de las imágenes de SEM. <sup>2</sup>Las condiciones de reacción fueron pNPB 0.5 mM en amortiguador de fosfatos (25 mM pH 7.0) a 25°C. <sup>3</sup>La actividad recuperada fue estimada de la actividad de los CLEAs con pNPB como sustrato. <sup>4</sup>Las condiciones de reacción fueron BFA 5 mM en amortiguador de acetato (10 mM, pH 5) a 25°C. <sup>5</sup>E fue calculado del coeficiente de las tasas de reacción de (S)-ácido mandélico/(R)-ácido mandélico. <sup>a,b,c,d,e</sup>Los valores con distintas letras son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ). Los valores presentados son el promedio de tres ensayos independientes.

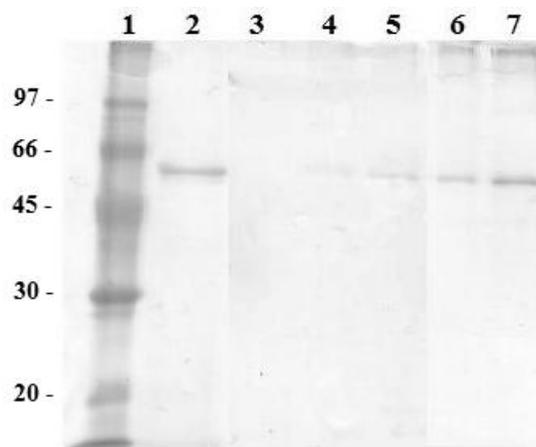
Del mismo modo, también se evaluó la enantioselectividad de los CLEAs preparados a diferentes cantidades de BSA añadida. Mientras que a bajas cantidades de BSA (<10 mg) la enantioselectividad permaneció constante (alrededor de  $E_{(S)} = 23$ ), al aumentar la cantidad de BSA (30 y 50 mg) se obtuvo una marcada disminución de la enantioselectividad (alrededor de  $E_{(S)} = 13$ ) (Tabla 11). Del mismo modo, la actividad específica de los CLEAs con BFA fue 22 veces mayor al adicionar 5 mg de BSA que al emplear 50 mg.

Por otro lado, la adición de BSA mostró un notable incremento en la estabilidad térmica de los CLEAs (Fig. 59). Los derivados más termoestables fueron obtenidos al añadir 10 mg de BSA. La misma mejora en estabilidad térmica se ha reportado para CLEAs de lacasas preparados a diferentes relaciones de enzima/BSA (Cabana *et al.*, 2007), así como, para los de la CALB (Cruz *et al.*, 2012) y los de penicilin acilasa (Shah *et al.*, 2006).



**Figura 59.** Efecto de la adición de BSA en la termoestabilidad de la CRL y CRL-CLEAs a 50°C, pH 7 por 22 h. Los símbolos representan la media de dos ensayos independientes  $\pm$  desviación estándar.

Sin embargo, a valores altos de BSA adicionada (30 y 50 mg), se obtuvieron CLEAs menos estables que al adicionar 10 mg de BSA. Probablemente, este resultado está relacionado a un menor grado de entrecruzamiento que ocurre al adicionar mayor cantidad de BSA a una misma concentración de EDC-NHS. Esta explicación es sostenida por la mayor cantidad de proteína liberada en el medio después de someter a los CLEAs a una prueba de estabilidad estructural por medio de un tratamiento térmico a 95°C por 5 min (Fig. 60).



**Figura 60.** Análisis en gel de SDS-PAGE de la CRL y CRL-CLEAs preparados a diferente cantidad de BSA añadida. Carril 1: marcador de pesos moleculares; carril 2: CRL libre; carril 3: CLEAs preparados sin adición de BSA; carril 4: CLEAs preparados con 5 mg de BSA; carril 5: CLEAs preparados con 10 mg de BSA; carril 6: CLEAs preparados con 30 mg de BSA; carril 7: CLEAs preparados con 50 mg de BSA. La electroforesis SDS-PAGE se llevó a cabo como se describe en 8.2.2.

### 9.3.3. Efecto de la longitud de cadena del agente de entrecruzamiento

Con el objetivo de evaluar el efecto de la longitud de cadena de la PEI en la preparación de los CLEAs, éstos fueron preparados empleando una concentración EDC-NHS de 28 mM y la adición de 10 mg de BSA. Los CLEAs preparados con el agente de entrecruzamiento de tamaño medio (PEI<sub>1.3</sub>) presentaron mayor actividad específica que los elaborados con el de menor tamaño (DH) (Tabla 12). Este efecto puede atribuirse a que los agentes de entrecruzamiento de mayor tamaño permiten la formación de CLEAs menos compactos con mayor espaciamiento entre cada molécula de enzima (Zhen *et al.*, 2013). Por otro lado, con los agentes de entrecruzamiento de mayor tamaño (PEI<sub>70</sub> y PEI<sub>750</sub>) los CLEAs fueron más grandes y menos activos que los obtenidos con la PEI<sub>1.3</sub>. Este efecto también fue reportado para los CLEAs entrecruzados con dextrano-aldehído (100-200 kDa) cuyos CLEAs presentaron un

entrecruzamiento menos adecuado que los obtenidos con glutaraldehído (0.1 kDa) (Valdés *et al.*, 2011).

**Tabla 12.** Efecto de peso molecular del agente de entrecruzamiento en las propiedades de los CLEAs.

Agente entrecruzante (AE)	Peso molecular del AE (kDa)	Diámetro del CLEA <sup>1</sup> (μm)	Actividad específica pNPB <sup>2</sup> (U/mg)	Actividad recuperada <sup>3</sup> (%)	Actividad específica BFA <sup>4</sup> (U/mg)	<i>ee</i> (%)	<i>E</i> <sup>5</sup> (S)
DH	0.12	10-70	30 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	3.0 <sup>a</sup>	87 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>
PEI <sub>1,3</sub>	1.3	50-100	33 <sup>b</sup>	12 <sup>b</sup>	3.3 <sup>a</sup>	91 <sup>b</sup>	22 <sup>b</sup>
PEI <sub>70</sub>	70	100-200	24 <sup>c</sup>	7 <sup>c</sup>	3.7 <sup>a</sup>	93 <sup>b</sup>	26 <sup>c</sup>
PEI <sub>750</sub>	750	100-300	22 <sup>c</sup>	11 <sup>d</sup>	1.8 <sup>b</sup>	91 <sup>b</sup>	21 <sup>b</sup>

Todos los CLEAs fueron preparados con 30 mg/mL [enzima], 28 mM [EDC-NHS], 10 mg de BSA y 3 g/L de cada agente entrecruzante. <sup>1</sup>Los diámetros de los CLEAs fueron estimados de las imágenes de SEM. <sup>2</sup>Las condiciones de reacción fueron pNPB 0.5 mM en amortiguador de fosfatos (25 mM pH 7.0) a 25°C. <sup>3</sup>La actividad recuperada fue estimada de la actividad de los CLEAs con pNPB como sustrato. <sup>4</sup>Las condiciones de reacción fueron BFA 5 mM en amortiguador de acetato (10 mM, pH 5) a 25°C. <sup>5</sup>*E* fue calculado del coeficiente de las tasas de reacción de (*S*)-ácido mandélico/(*R*)-ácido mandélico. <sup>a,b,c,d,e</sup>Los valores con distintas letras son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ). Los valores presentados son el promedio de tres ensayos independientes.

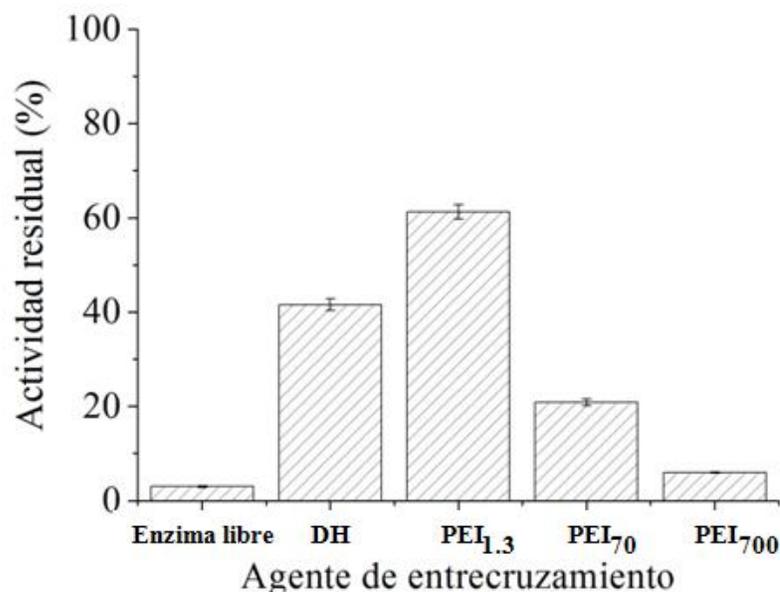
En cuanto a su enantioselectividad, a mayor longitud de cadena del agente de entrecruzamiento, los CLEAs fueron más enantioselectivos, mientras que su actividad específica sobre el BFA fue casi independiente del tamaño molecular del agente de entrecruzamiento (Tabla 12). Las PEIs empleadas en este trabajo son polímeros iónicos los cuales proveen un micro ambiente con cargas positivas alrededor de la enzima y son responsables de las condiciones hidrofílicas y electrostáticas que las rodean. Por lo tanto, las diferencias en el grado de polimerización de las PEIs pueden modificar de maneras distintas el equilibrio de apertura-cierre de la tapa de las lipasas y la conformación del sitio catalítico, resultando en derivados enzimáticos con enantioselectividad diferente.

El equilibrio de apertura-cierre de la tapa de las lipasas también es mediado por interacciones electrostáticas entra la superficie de la enzima y la cara externa de la tapa cuando ésta última se encuentra en su forma abierta. Estas interacciones pueden ser modificadas en presencia de polímeros hidrofílicos alrededor de la enzima. Por lo tanto, en este caso en particular, las PEIs de mayor tamaño proveen un mayor microambiente cargado positivamente, resultando en cambios conformacionales más marcados en la estructura de la enzima. Como

resultado de estos cambios, se observó una enantioselectividad mejorada en la reacción hidrolítica del BFA (Tabla 12).

Como ejemplo, los CLEAs preparados con DH (DH-CLEAs) presentaron una enantioselectividad similar a la obtenida con el derivado de la CRL inmovilizado en BrCN ( $E = 14$  y  $E = 9.4$ , respectivamente) el cual provee a la enzima de un ambiente hidrofílico pero de carga neutral. Por otro lado, los agentes poliméricos como la PEI<sub>1.3</sub> y PEI<sub>70</sub> proveen a la enzima de un mayor ambiente hidrofílico cargado positivamente, mostrando una marcada mejora en la enantioselectividad de sus respectivos CLEAs en comparación con los derivados DH-CLEA y el CRL-BrCN. Sin embargo, un aumento excesivo de las cargas positivas que rodean a la enzima (como por ejemplo cuando la PEI<sub>750</sub> fue empleada) disminuyó la enantioselectividad de la enzima ya que los CLEAs producidos con PEI<sub>750</sub> fueron menos enantioselectivos que los CLEAs producidos con PEI<sub>70</sub>. Con el objetivo de mejorar la mayor enantioselectividad obtenida, se prepararon CLEAs con una PEI de tamaño intermedio entre la PEI<sub>1.3</sub> la PEI<sub>70</sub>. Dicho polímero fue la PEI<sub>25</sub>, sin embargo, se obtuvo la misma enantioselectividad que con la PEI<sub>1.3</sub> (resultados no mostrados).

Así mismo, la longitud de los agentes de entrecruzamiento tuvo un marcado efecto en la estabilidad térmica de los CLEAs (Fig. 61). Los CLEAs pequeños y compactos obtenidos con el DH y la PEI<sub>1.3</sub> fueron más termoestables que aquellos de mayor tamaño y espaciamento obtenidos con las PEIs más grandes. El derivado más termoestable fue el PEI<sub>1.3</sub>-CLEA, preparado con 10mg de BSA y 28 mM de EDC-NHS. Bajo estas condiciones de producción, el derivado mantuvo el 61% de su actividad inicial después de 22 h de incubación a 50°C, mientras que la enzima libre perdió más del 50% de su actividad inicial en menos de 2 h (Fig. 57).

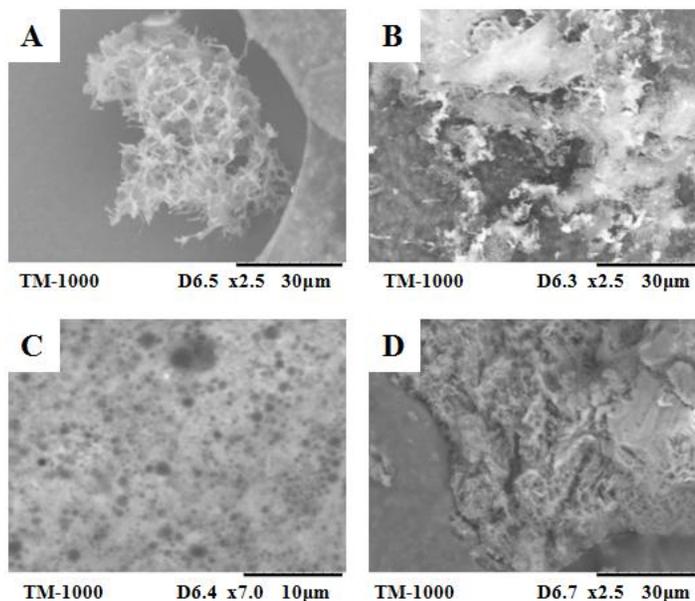


**Figura 61.** Efecto del agente de entrecruzamiento en la termoestabilidad de la CRL y CRL-CLEAs a 50°C, pH 7 por 22 h. Las barras representan la media de dos ensayos independientes  $\pm$  desviación estándar.

Además de emplearse para la mejora de la termoestabilidad, las PEIs se han empleado para el recubrimiento de enzimas inmovilizadas sobre soportes persistentes y han sido exitosamente utilizadas para mejorar la estabilidad de los biocatalizadores enzimáticos durante la síntesis de compuestos hidrofóbicos en solventes orgánicos (Guisan *et al.*, 2001). Dicho efecto estabilizante, puede atribuirse al microambiente hidrofílico creado alrededor de la enzima. Este ambiente es capaz de mantener una capa de agua que rodea a la enzima, que es crucial para mantener la flexibilidad de la enzima y además puede disminuir la concentración de solvente orgánico en un sistema bifásico (Cabrera *et al.*, 2010).

El tamaño de los CLEAs es una propiedad importante para su aplicación a larga escala, ya que está directamente implicada en su transferencia de masa y filtrabilidad (Sheldon, 2011b). Preferentemente, los CLEAs porosos y de menor tamaño de partícula son más favorables debido a que permiten mayor contacto enzima-sustrato, mientras que los de tamaño de partícula mayor disminuyen la probabilidad de formación del complejo enzima-sustrato de las enzimas entrecruzadas en el interior de la partícula desperdiciando su actividad (Talekar *et al.*, 2013). Típicamente, el tamaño de partícula de los CLEAs varía desde 0.1 hasta 200  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, durante los ciclos de reuso, las operaciones de filtrado y centrifugado promueven la formación de *clusters* (agregados de CLEAs), los cuales presentan limitaciones de transferencia de masa con la consecuente reducción de la actividad específica de los CLEAs (Aytar & Bakir, 2008). La

concentración tanto de enzima como la del agente de entrecruzamiento son variables importantes que rigen el tamaño de los CLEAs. Ambos parámetros pueden modificar la actividad recuperada en forma de CLEA (Valdés *et al.*, 2011). El efecto en el tamaño de partícula de los CLEAs fue estimado con SEM. Las imágenes revelaron que el tamaño y morfología de los CLEAs es fuertemente afectado por el tipo y tamaño del agente de entrecruzamiento empleado (Fig. 62).



**Figura 62.** Diferencias en el tamaño y morfología de los CLEAs debidas al tipo y tamaño del agente de entrecruzamiento. A) DH-CLEA, B) PEI<sub>1,3</sub>-CLEA, C) PEI<sub>70</sub>-CLEA y D) PEI<sub>750</sub>-CLEA.

Como se esperaba, los agentes de entrecruzamiento de menor tamaño produjeron CLEAs más pequeños, mientras que los de mayor tamaño lograron CLEAs de tamaño más grande (Tabla 12). Además, el tipo de agente entrecruzante también afectó la forma de los CLEAs. Con los agentes de tamaño pequeño (DH) y medio (PEI<sub>1,3</sub>) se obtuvieron agregados entrecruzados con forma de una red ramificada con forma de rizos (Fig. 62, A y B), mientras que los CLEAs obtenidos con agentes de tamaño mayor (PEI<sub>70</sub> y PEI<sub>750</sub>) presentaron forma de una red porosa homogénea (Fig. 62, C y D).

Con base en la actividad específica, la actividad recuperada, la termoestabilidad y la enantioselectividad; las mejores condiciones para la producción de CRL-CLEAs fueron la PEI<sub>1,3</sub> como agente de entrecruzamiento, la adición de 10 mg de BSA y una concentración de EDC-NHS de 28 mM. A pesar de que los PEI<sub>70</sub>-CLEAs mostraron mayor enantioselectividad que los PEI<sub>1,3</sub>-CLEAs, éste último mostró ser tres veces más termoestable (Fig. 61), mientras que la

mejora en enantioselectividad del PEI<sub>70</sub>-CLEA no fue tan marcada (1.2 veces mayor). Los CLEAs preparados bajo las condiciones anteriormente mencionadas, fueron comparados con los CLEAs entrecruzados con glutaraldehído. Dicha comparación se hizo en términos de actividad específica, actividad recuperada, estabilidad térmica y enantioselectividad.

#### **9.3.4. Comparación de los CLEAs entrecruzados vía amino vs vía carboxilo**

Tradicionalmente, el glutaraldehído es el agente entrecruzante elegido para la preparación de los CLEAs. Por lo tanto, se hizo la comparación de los amino-CLEAs (obtenidos por entrecruzamiento con GA) y los carboxi-CLEAs. Ambos fueron preparados en presencia de PEI<sub>1,3</sub> (a la misma concentración), 10 mg de BSA añadida e igual tiempo de entrecruzamiento (30 min).

Los carboxi-CLEAs presentaron mayor actividad que los amino-CLEAs ya que en la hidrólisis de *p*NPB y BFA los primeros tuvieron 1.3 y 2.3 veces más actividad, respectivamente, que los segundos (Tabla 13). Aunado a esto, los carboxi-CLEAs fueron más termoestables que los amino-CLEAs (Tabla 13). Este incremento en estabilidad puede ser explicado en términos de rigidez molecular, ya que los carboxi-CLEAs presentan un mayor grado de entrecruzamiento que los amino-CLEAs gracias a la mayor abundancia de los residuos con grupos carboxilo en comparación con los residuos con grupos amino de la enzima. Este efecto también fue encontrado para los CALB-CLEAs entrecruzados con GA tras la aminación de los grupos carboxilo de la enzima con etilendiamina, los cuales fueron más termoestables que los CALB-CLEAs entrecruzados exclusivamente con GA sin aminación previa (Galvis *et al.*, 2012). En cuanto a su selectividad, ambos CLEAs exhibieron una enantioselectividad similar en la resolución del (*S*)-ácido mandélico, alcanzando el mismo exceso enantiomérico (Tabla 13).

**Tabla 13.** Efecto de diferentes sitios de unión durante la preparación de CRL-CLEAs

Sitio de unión para el entrecruzamiento	Actividad específica <i>p</i> NPB <sup>1</sup> (U/mg)	Actividad recuperada <sup>2</sup> (%)	Actividad residual <sup>3</sup> (%)	Actividad específica BFA <sup>4</sup> (U/mg)	<i>ee</i> (%)	<i>E</i> <sup>5</sup> ( <i>S</i> )
Grupos carboxilo	33 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	61	3.2 <sup>a</sup>	91 <sup>a</sup>	22 <sup>a</sup>
Grupos amino	24 <sup>b</sup>	12 <sup>a</sup>	19	1.4 <sup>b</sup>	92 <sup>a</sup>	26 <sup>b</sup>

Todos los CLEAs fueron preparados con 30 mg/mL [enzima], 28 mM [EDC-NHS] ó 14 mM [GA], 10 mg de BSA y [PEI<sub>1,3</sub>] 3 g/L. <sup>1</sup>Las condiciones de reacción fueron *p*NPB 0.5 mM en amortiguador de fosfatos (25 mM pH 7.0) a 25°C. <sup>2</sup>La actividad recuperada fue estimada de la actividad de los CLEAs con *p*NPB como sustrato. <sup>3</sup>El ensayo de estabilidad térmica fue realizado por incubación a 50°C, pH 7 por 22 h. <sup>4</sup>Las condiciones de reacción fueron BFA 5 mM en amortiguador de acetato (10 mM, pH 5) a 25°C. <sup>5</sup>*E* fue calculado del coeficiente de las tasas de reacción de (*S*)-ácido mandélico/(*R*)-ácido mandélico. <sup>a,b,c,d,e</sup>Los valores con distintas letras son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ). Los valores presentados son el promedio de tres ensayos independientes.

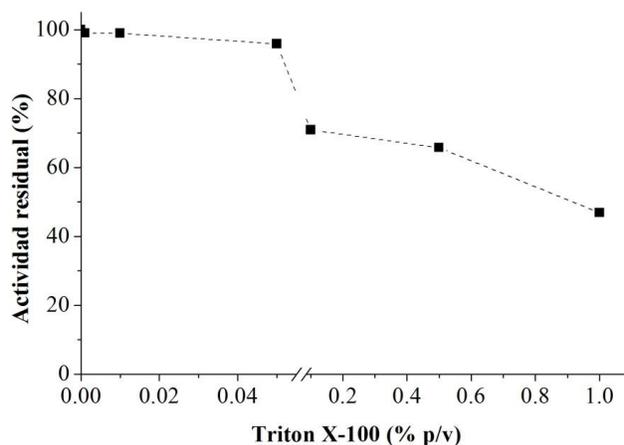
Finalmente, la preparación de CLEAs vía entrecruzamiento de los grupos carboxilo de las enzimas por activación con EDC-NHS y unión irreversible con PEI demostró ser una metodología potencial para ser empleada en el entrecruzamiento de enzimas ya que los carboxi-CLEAs presentaron mayor actividad específica y estabilidad térmica que los amino-CLEAs, mientras que ambos exhibieron una enantioselectividad similar hacia el (*S*)-ácido mandélico.

#### 9.4. Inmovilización de la CRL sobre soportes de agarosa

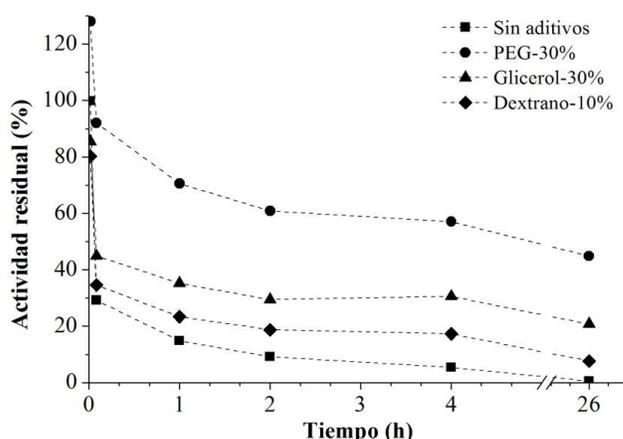
Como parte complementaria de este trabajo se prepararon derivados de la CRL inmovilizados sobre soportes de agarosa para su comparación con los derivados de la CRL en forma de carboxi- y amino-CLEAs. La agarosa es un biopolímero extraído de las algas marinas y está formado principalmente por unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosas y  $\alpha$ -D/L-galactopiranosas (Rinaudo, 2008). Durante varias décadas se ha empleado extensivamente para la inmovilización de enzimas gracias a que es bastante inerte, de fácil manejo y activación; además de que la actividad de las enzimas inmovilizadas en este material puede ser analizada por métodos espectrofotométricos y puede emplearse en reactores de lote gracias a que es compresible y soporta condiciones de agitación suaves (Guisán, 1988). Para llevar a cabo la inmovilización en soportes de agarosa, fue necesario el estudio de la estabilización de la CRL en condiciones desnaturalizantes de pH. Dichas condiciones son requeridas para algunas de las metodologías de inmovilización sobre soportes de agarosa, así como algunas otras como el efecto de los detergentes sobre la actividad de la CRL.

La CRL tiene una fuerte tendencia a formar dímeros lipasa-lipasa cuando se encuentra en medio acuoso (Palomo *et al.*, 2003). Dichos dímeros pueden presentar propiedades catalíticas distintas a las de la enzima en su forma monomérica (Palomo *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2006b). Por lo tanto, para evitar la inmovilización de dímeros de la enzima fue necesario el empleo de un detergente. Para ello, primero se realizó un estudio del efecto de la concentración de Triton X-100 en la actividad de la enzima (Fig. 63). Concentraciones menores al 0.05% del detergente no tienen efecto negativo sobre la actividad de la CRL, por lo que se seleccionó la concentración de 0.05% de Triton X-100 para la preparación de los derivados de la CRL inmovilizados en soportes de agarosa. Además, se ha reportado que a con una concentración de Triton X-100 de 0.1% se puede medir más del 90% de la actividad específica relativa de la CRL (dicho valor no contempla la inhibición causada por el detergente a la concentración empleada) independientemente de la concentración de la misma (en un intervalo de hasta 4  $\mu\text{g}$  de proteína/mL) (Palomo, 2003).

**Figura 63.** Efecto del Triton X-100 sobre la actividad de la CRL. En todos los casos se empleó un volumen de reacción 2 mL en una celda de UV-VIS con 1  $\mu\text{g}$  de preparación comercial de CRL/mL. El sustrato empleado fue 0.5 mM de *p*NPB en amortiguador de fosfatos (25 mM pH 7) a 25°C.

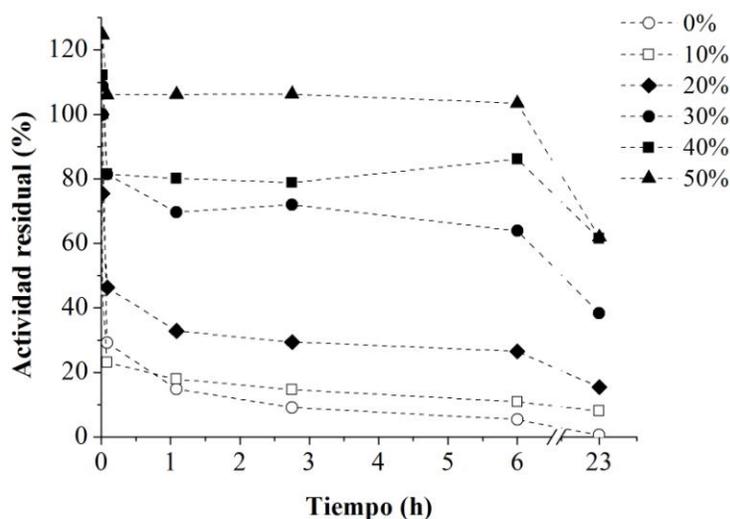


Así mismo, fue necesario llevar a cabo un estudio de estabilización de la CRL en condiciones de pH alcalino (pH = 10); ya que la inmovilización de enzimas sobre soportes glioxil-agarosa requiere estas condiciones de pH para poder llevar a cabo la unión multipuntual de los grupos amino presentes en la enzima. Debido a su capacidad de retención de agua, se ha reportado que los polioles crean un efecto amortiguador de pH alrededor de la enzima, con la consecuente estabilización de las mismas en condiciones de pH alcalino (Christakopoulos *et al.*, 1998; Park & Kajichi, 1995). Por ello, se evaluó el efecto estabilizante de 3 diferentes polioles (Fig. 64).



**Figura 64.** Cinética de inactivación de la CRL a pH 10 en presencia de polioles. En todos los casos se incubaron 73  $\mu\text{g}$  de preparación comercial de CRL/mL. Para medir actividad el sustrato empleado fue *p*NPB como se describe en 8.1 en ensallo en celda de 3 mL.

Como agente estabilizante de la CRL a pH alcalino se seleccionó el polietilenglicol (PEG), ya que éste tuvo el mayor efecto estabilizante logrando preservar el 44% de la actividad inicial después de 26 h de incubación a pH 10. Posteriormente se evaluaron diferentes concentraciones de PEG en las mismas condiciones de pH (Fig. 65).



**Figura 65.** Cinética de inactivación de la CRL a pH 10 en presencia de polietilenglicol (PEG). En todos los casos se incubaron 73  $\mu\text{g}$  de preparación comercial de CRL/mL. Para medir actividad el sustrato empleado fue *p*NPB como se describe en 8.1 en ensallo en celda de 3 mL.

La adición de PEG al 40 y 50% logró mantener el 62% de la actividad inicial de la CRL después de 23 h de incubación a pH 10. El PEG es un polímero inerte que presenta muy poca interacción con la CRL, además de que se ha demostrado que afecta muy poco su actividad enzimática, aunado a que no altera la estabilidad termodinámica de la isoforma Lip1 de la CRL (Bassani *et al.*, 2010). Con los resultados anteriores, se seleccionó el PEG al 40% para llevar a cabo la inmovilización de la CRL en condiciones de pH alcalino. La concentración de 50% de

PEG se descartó ya que la alta viscosidad de la solución dificulta la agitación durante el proceso de inmovilización.

En muchos casos, la inmovilización está asociada a la pérdida de actividad enzimática y a la afectación de otras de sus propiedades catalíticas. Por ello, se requiere llevar a cabo el estudio de una variedad de soportes que permitan orientaciones y situaciones diferentes de la enzima con el fin de obtener alguna en donde la enzima presente propiedades mejoradas (Rodrigues *et al.*, 2013). Por este motivo, se prepararon derivados de la CRL con orientaciones diferentes de la enzima mediante su inmovilización en soportes de agarosa activados con 6 diferentes grupos reactivos (Tabla 14).

**Tabla 14.** Soportes de agarosa activados con diferentes grupos funcionales y su orientación empleados en esta tesis

<b>Soporte</b>	<b>Tipo de unión</b>	<b>Orientación de la enzima</b>
BrCN	covalente unipuntual	unión del amino terminal
Glioxil	covalente multipuntual	zona más rica en lisinas
GA	1 <sup>ro</sup> - adsorción iónica	1 <sup>ro</sup> - zona más rica en cargas negativas
	2 <sup>do</sup> - unión covalente	2 <sup>do</sup> - zona más rica en lisinas
MANAE	adsorción iónica	zona más rica en cargas negativas
Octil	adsorción hidrofóbica	zona con más residuos hidrofóbicos
Naftil		

El estudio de la inmovilización de enzimas sobre un soporte requiere la preparación de derivados diluidos, ya que con derivados altamente cargados se presentan fenómenos de baja difusión del sustrato enmascarando el verdadero efecto de la inmovilización sobre la actividad de la enzima (Guisán, 1988). Debido a lo anterior, la inmovilización de la CRL en los seis soportes probados se llevó a cabo a tres diferentes cargas enzimáticas: 1, 10 y 100 mg de preparación comercial de CRL/g soporte (Tabla 15). Como se demuestra en la tabla 15, independientemente del tipo de soporte empleado, la mayor actividad expresada inmovilizada ( $A_{ei}$ ) se recupera a menores cargas enzimáticas. De manera que con los derivados de carga enzimática de 1mg/g de soporte se pudo observar el efecto real del tipo de inmovilización sobre la actividad enzimática resultante.

**Tabla 15.** Inmovilización de la CRL sobre soportes de agarosa a diferentes cargas enzimáticas

Derivado de CRL	Carga: 1 mg <sup>*</sup> /g soporte		Carga: 10 mg <sup>*</sup> /g soporte		Carga: 100 mg <sup>*</sup> /g soporte	
	Y <sup>1</sup> (%)	A <sub>ei</sub> <sup>2</sup> (%)	Y <sup>1</sup> (%)	A <sub>ei</sub> <sup>2</sup> (%)	Y <sup>1</sup> (%)	A <sub>ei</sub> <sup>2</sup> (%)
	BrCN	86	24	54	15	75
GA	100	4	100	8	95	6
glioxil	100	28	99	7	92	4
Octil	100	72	100	53	100	3
Naftil	100	90	41	24	12	54
MANAE	79	42	83	14	29	12

\* Miligramos de preparación comercial de la CRL. <sup>1</sup>Y = rendimiento de inmovilización, definido por  $Y = [(actividad\ inicial - actividad\ en\ sobrenadante) / (actividad\ inicial)]$ . <sup>2</sup>A<sub>ei</sub> = actividad expresada inmovilizada, definida por  $A_{ei} = (actividad\ final\ del\ derivado) / (actividad\ inicial - actividad\ sobrenadante)$ .

La mayor A<sub>ei</sub> se obtuvo con los soportes de adsorción hidrofóbica (octil- y naftil-agarosa), alcanzando hasta un 90% con la naftil-agarosa. Por otro lado, con el soporte octil-agarosa se logró inmovilizar el 100% de la enzima ofrecida con cargas desde 1 hasta 100 mg/g soporte; sin embargo la A<sub>ei</sub> se redujo a la mitad al pasar de 1 a 10 mg/g soporte y más drásticamente al pasar de 1 a 100mg/mg soporte (A<sub>ei</sub> = 72% y 3%, respectivamente). En cambio, con el soporte naftil-agarosa, únicamente se logró inmovilizar el 100% de la enzima a la carga enzimática más baja. De manera que el soporte octil-agarosa presenta mayor afinidad por la enzima que el de naftil-agarosa. Esto puede explicarse por la diferencia en tamaño molecular de los sustituyentes de cada grupo activo en el soporte. Los grupos octilo presentan un tamaño menos voluminoso que los grupos naftilo (el grupo naftilo presenta dos anillos bencénicos en su estructura, mientras que el grupo octilo es una cadena alifática lineal de 8 carbonos). Dicha diferencia estructural permite un mayor contacto entre la enzima y el grupo activo menos voluminoso, además de que probablemente ambos soportes presentan diferente cantidad de grupos activos por unidad de superficie (probablemente sea menos densa en la naftil-agarosa). Se ha reportado que el soporte octil-agarosa 4BCL tiene una capacidad de carga máxima de hasta 20-30 mg/mL de una proteína de tamaño de alrededor de 60 kDa (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998). En comparación con las cargas enzimáticas probadas en este trabajo, la más alta (100 mg de preparación comercial de CRL/g de soporte) representa alrededor del 10% de la máxima capacidad de carga de la octil-agarosa (la preparación enzimática comercial tiene alrededor de 20 mg de proteína/g polvo). En resultados similares se recuperó el 90% de la actividad residual de la CRL a una carga

enzimática de 1 mg/mL de soporte al inmovilizar esta enzima sobre octil-agarosa (Palomo, 2003).

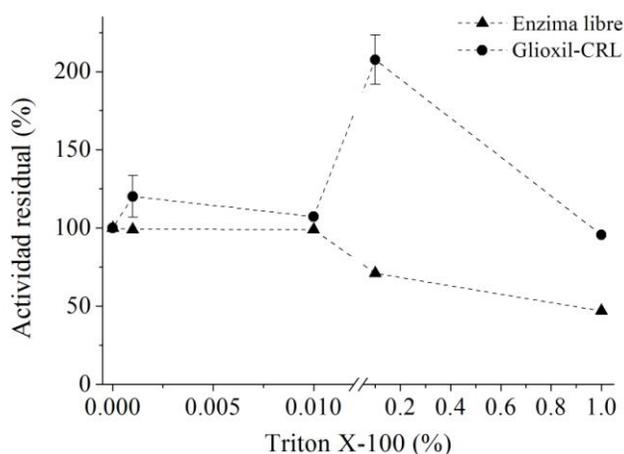
Comúnmente, en la inmovilización de lipasas, los soportes de adsorción hidrofóbica suelen recuperar la mayor cantidad de actividad expresada inmovilizada ( $A_{ei}$ ) en comparación con otros soportes en donde hay unión química o adsorción por cargas. Incluso, se ha reportado que las lipasas adsorbidas en soportes hidrofóbicos presentan un fenómeno de hiperactivación al encontrarse adsorbidas sobre la superficie hidrofóbica del soporte (Fernandez-Lorente *et al.*, 2008; Palomo *et al.*, 2002b). Esta hiperactivación se explica ya que el tipo de interacción hidrofóbica enzima-soporte simula las condiciones de activación interfacial de las lipasas al contacto con interfases aceite-agua (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998).

Cuando la CRL fue inmovilizada sobre un soporte de intercambio aniónico (MANAE-agarosa) la enzima fue adsorbida rápidamente al soporte (30 min) junto con la pérdida del 58% de la actividad inmovilizada (Tabla 15). Sin embargo, la pérdida de actividad no fue tan drástica como la obtenida al inmovilizar la enzima en soportes de unión covalentemente. Así mismo, se ha reportado la inmovilización de la CRL sobre soportes de intercambio aniónico como la agarosa activada con PEI (PEI-agarosa), en donde el mecanismo de unión enzima-soporte es el mismo que con la MANAE-agarosa. En este estudio, se logró recuperar cerca del 80% de la actividad inmovilizada (Palomo, 2003).

La inmovilización covalente de la CRL sobre los soportes probados, se llevó a cabo en tiempo bastante cortos (7 y 30 min para BrCN y GA-agarosa, respectivamente; y de 15 a 30 min para la glioxil-agarosa), de manera que los grupos superficiales de la enzima presentan una fuerte reactividad frente a los grupos reactivos de este tipo de soportes. No obstante, el derivado preparado en glioxil-agarosa requiere de una incubación más prolongada (24 h) para garantizar la formación de un mayor número de enlaces que permitan una unión multipuntual entre la enzima y el soporte. De estos tres soportes, aquel en donde la enzima presentó menor  $A_{ei}$  fue la GA-agarosa (4%), mientras que en los soportes BrCN- y glioxil-agarosa la enzima logró expresar alrededor del 26% de la actividad inmovilizada (Tabla 15). Por lo que éste tipo de soportes de unión covalente provocan la pérdida de más del 70% de la actividad inmovilizada posiblemente debido a dos motivos: 1) una inadecuada orientación de la enzima que aumenta los problemas estéricos para reconocer el sustrato, y 2) causan modificaciones estructurales de la CRL que provocan la pérdida de la actividad inmovilizada, incluso cuando la enzima se une únicamente por el extremo del amino terminal (soporte BrCN-agarosa). En comparación con los resultados

obtenidos en la presente tesis, se ha reportado la inmovilización de la CRL en GA-agarosa, en donde recuperaron el 23% de la actividad inicial empleando una carga enzimática de 1 mg/mL de soporte (Palomo, 2003). Sin embargo, el reporte mencionado anteriormente llevó a cabo la inmovilización a pH 6 y en ausencia de Triton X-100, lo que podría explicar las diferencias encontradas.

A pesar de de la baja actividad residual de la CRL inmovilizada sobre soportes de unión covalente, dichos derivados presentan cambios interesantes en sus propiedades catalíticas. Por ejemplo, al estudiar el fenómeno de inhibición/activación del Triton X-100 sobre el derivado de la CRL inmovilizado en glioxil-agarosa (glioxil-CRL), observamos efectos diferentes a los encontrados con la CRL libre (Fig. 66). Mientras que una concentración menor a 0.1% de Triton X-100 tiene un efecto poco marcado en la actividad de la enzima, a concentraciones de 0.2% del detergente la enzima libre se ve inhibida en más de un 25%, mientras que la glioxil-CRL presenta un fenómeno de hiperactivación del 200%.



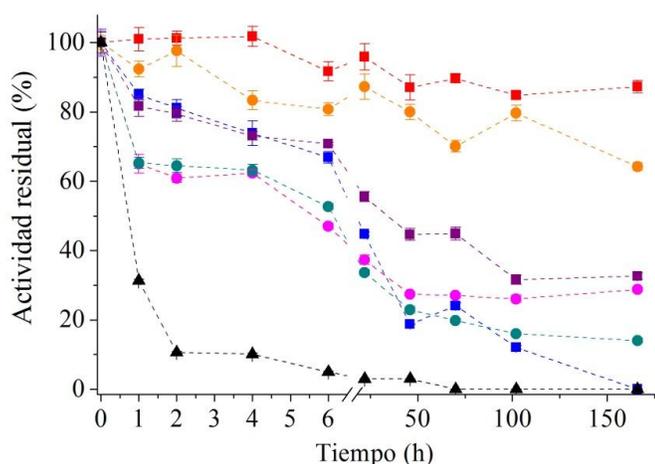
**Figura 66.** Efecto del Triton X-100 en la actividad de la CRL y en su derivado glioxil-CRL. En todos los casos se empleó un volumen de reacción 2 mL en una celda de UV-VIS con 1  $\mu$ g de preparación comercial de CRL/mL, ó 50 mg del derivado de la CRL en soporte. El sustrato empleado fue *p*NPB como se describe en 8.1 en celda de 3 mL.

### 9.5. Estabilidad de los derivados de la CRL inmovilizados en forma de CLEAs y sobre soportes de agarosa

Además de permitir la reutilización de las enzimas, el proceso de inmovilización también ha sido ampliamente empleado para aumentar la estabilidad enzimática frente a condiciones desestabilizantes /desnaturalizantes (Adlercreutz, 2013; Stepankova *et al.*, 2013). Con la finalidad de evaluar la estabilización de los derivados de la CRL, se evaluó su estabilidad frente a la temperatura y solventes.

### 9.5.1. Estabilidad térmica de los derivados de la CRL inmovilizados en forma de CLEAs y sobre soportes de agarosa

Dado que la termoestabilidad de los CRL-CLEAs ya se había determinado (ver sección 9.3, Figs. 57, 59, 61 y Tabla 13), se procedió a evaluar la estabilidad térmica de los derivados de la CRL inmovilizados sobre soportes a 50°C y pH 7 (Fig. 67). El derivado más estable fue el de glioxil-CRL que logró mantener el 87% de actividad residual durante 150 h. Este resultado era esperado ya que en comparación con los demás soportes probados, la unión multipuntual que provee el soporte glioxil-agarosa es la más intensa de todas, logrando una gran estabilización de la estructura tridimensional de la enzima (Mateo *et al.*, 2006). Este tipo de soporte se ha empleado para la mejora en la estabilidad térmica de numerosas enzimas (Mateo *et al.*, 2007b). Por otro lado el derivado de unión covalente GA-agarosa, también mostró una estabilización de la enzima (55% de su actividad inicial a las 22 h de incubación a 50°C). Sin embargo, en tiempos de incubación más prolongados, sólo mantuvo el 35% de su actividad residual. Otros reportes han logrado mantener el 60% de la actividad del GA-CRL durante 100 h de incubación a 45°C (Palomo *et al.*, 2002b). En contraste, el derivado BrCN-CRL mostró la menor estabilidad térmica en comparación con los otros dos derivados de unión covalente (48% y 2%, de actividad residual a las 22 y 150 h de incubación, respectivamente). A pesar de que éste derivado únicamente provee a la enzima de una unión covalente unipuntual por el extremo del amino terminal, en tiempos de incubación < 20 h se observó una mejora en la estabilidad térmica en comparación con la enzima libre.



**Figura 67.** Inactivación térmica de la CRL y sus diferentes derivados inmovilizados sobre soportes de agarosa. (■) Glioxil-CRL, (●) Naftil-CRL, (■) GA-CRL, (■) BrCN-CRL, (●) Octil-CRL, (●) MANAE-CRL y (▲) CRL libre. En todos los casos se incubaron 2 mL de suspensión (1:10) de cada derivado en amortiguador fosfatos 25 mM pH 7 a 50°C. La actividad residual se midió con *p*NPB como sustrato. Los símbolos representan el valor promedio de dos ensayos independientes  $\pm$  desviación estándar.

En comparación con la estabilidad enzimática lograda con la inmovilización covalente en forma de CLEAs, el derivado más estable (PEI<sub>1,3</sub>-CLEA con 10 mg de BSA y 28 mM de EDC-NHS) logró mantener el 30% de su actividad inicial después de 150 h de incubación a 50°C en las mismas condiciones (datos no mostrados). De manera que, a pesar de la ausencia de un soporte, el efecto estabilizante obtenido con el entrecruzamiento fue casi igual que el de la GA-CRL, pero menor que el obtenido con la glioxil-CRL. Otro estudio ha reportado la comparación del efecto estabilizante frente a la temperatura al inmovilizar la enzima penicilin G acilasa (PGA) sobre soportes GA-agarosa y en forma de PGA-CLEAs (Wilson *et al.*, 2004a). Dicho trabajo ha reportado que se obtiene un mayor efecto estabilizante con el derivado de PGA inmovilizado sobre soporte (GA-PGA), en comparación con los CLEAs ( $\approx 80\%$  y  $\approx 20\%$  de actividad residual después de incubación a 50°C por 24 h, GA-PGA y PGA-CLEA, respectivamente) (Wilson, 2004). Por otro lado, otros reportes encontraron que los CLEAs de la enzima glutaril acilasa (GAC-CLEAs) recubiertos con una mezcla de PEI-PEG (PEG-PEI-GAC-CLEAs), mostraron una mayor estabilidad térmica que un derivado de GAC adsorbido por intercambio aniónico en un soporte PEI-agarosa ( $\approx 80$  y  $\approx 30\%$  de actividad residual después de incubación a 45°C por 9 h, PEI-PEG-GAC-CLEA y PEI-GAC, respectivamente) (López-Gallego, 2006). Con estos resultados, podemos decir que el efecto termoestabilizante obtenido por entrecruzamiento de enzimas en forma de CLEAs entrecruzados en presencia de PEI, es similar al logrado con soportes de unión covalente multipuntual como los soportes GA-agarosa; con la ventaja de que los primeros no requieren el empleo de un soporte.

En cuanto al efecto estabilizante obtenido con los soportes de adsorción enzimática, se obtuvo una notable estabilización de la CRL al estar inmovilizada en el soporte naftil-agarosa (64% actividad residual a las 150 h), mientras que con la octil-agarosa el efecto fue menos marcado (33% y 14% de actividad residual a las 22 y 150 h, respectivamente). A pesar de que ambos soportes tienen una interacción hidrofóbica con la enzima, el efecto estabilizante fue 4.6 veces mayor con el más hidrofóbico. Probablemente, esta diferencia pueda explicarse en términos de la intensidad de la interacción hidrofóbica enzima-soporte, resultando en derivados más estables cuando la interacción es más intensa. Estos resultados concuerdan con otros reportes en donde han encontrado una marcada estabilización de la CRL al ser inmovilizada en un soporte de adsorción hidrofóbica (octadecyl-sepabeads), el cual mantuvo el 100% de actividad inicial durante 100 h de incubación a 45°C y pH 7 (Palomo *et al.*, 2002b). Mientras que en otro reporte,

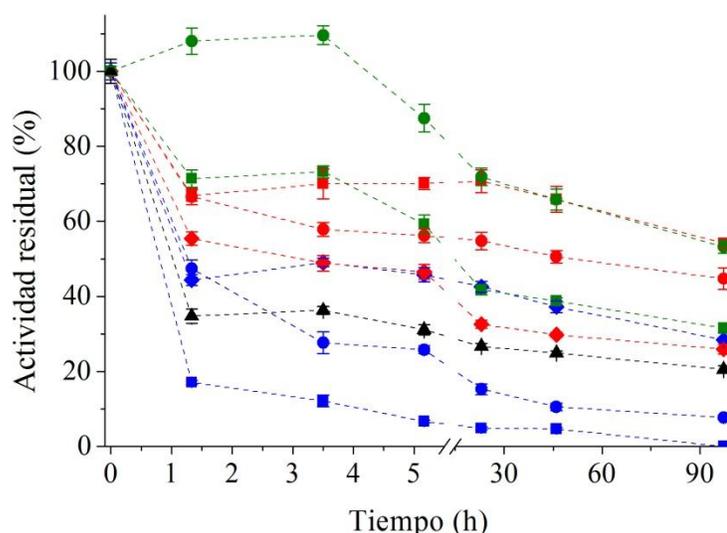
el derivado octil-CRL mantuvo poco menos del 50% de su actividad inicial al ser incubado a 50°C pH 7 por 100 h (Pizarro *et al.*, 2012).

Por último, el derivado MANAE-CRL inmovilizado por intercambio aniónico, también mostró una termoestabilidad mejorada en comparación con la enzima libre, y ligeramente mayor a la obtenida con la octil-CRL. Otros reportes en donde se empleó PEI-CRL, lograron mantener cerca del 80% de la actividad inicial después de 100 h de incubación a 37°C y pH 7 (Palomo *et al.*, 2002a).

### **9.5.2. Estabilidad en solventes orgánicos de los derivados de la CRL inmovilizados en forma de CLEAs y sobre soportes de agarosa**

Una de las características más interesantes de las lipasas es su aplicación en reacciones de síntesis en medios no acuosos (Adlercreutz, 2013; Carrera & Riva, 2008; Klibanov, 2001). Sin embargo, generalmente en estas condiciones de reacción las enzimas no son suficientemente estables. Por este motivo, se estudió la estabilidad de la CRL y sus derivados inmovilizados frente a varios solventes: etanol, metanol y ciclohexano.

El primer solvente probado fue el etanol (50%), el cual es un solvente polar (Fig. 68). La enzima libre perdió el 65% de su actividad inicial después de 1.3 h en contacto con dicho solvente, manteniendo sólo el 20% después de 97 h. Con seis de los derivados de la CRL preparados se logró una mayor estabilidad que con la enzima libre. Aquellos más estables fueron los inmovilizados vía unión covalente, entre ellos el amino-CLEA, glioxil-CRL y GA-CRL lograron mantener alrededor del 50-60% de su actividad inicial después de 97 h. A pesar de que el carboxi-CLEA mostró una estabilidad similar a las anteriores antes de las 5 h (60% actividad residual), después de las 23 h de incubación su actividad residual fue menor al 50%, perdiendo un 10% más después de las 97 h. La estabilización frente al etanol lograda con los PEI-CLEAs se puede explicar gracias al microambiente hidrofílico generado alrededor de la enzima, el cual disminuye el contacto del solvente con la enzima (Guisan *et al.*, 2001). Por otro lado, los derivados como la glioxil- y la GA-CRL favorecen la inmovilización de la lipasa en su forma con la tapa cerrada (Palomo *et al.*, 2002b), lo que estabiliza la forma del sitio catalítico además de prevenir un alto contacto del solvente con esta zona.

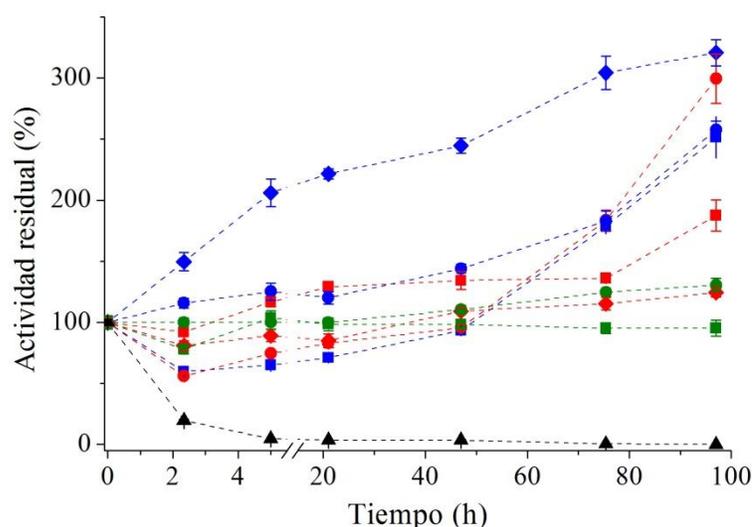


**Figura 68.** Estabilidad de la CRL y de sus diferentes derivados inmovilizados sobre soportes de agarosa en presencia de etanol. (■) Glioxil-CRL, (●) GA-CRL, (◆) BrCN-CRL, (■) MANAE-CRL, (●) Octil-CRL, (◆) Naftil-CRL, (■) Carboxi-CLEA, (●) Amino-CLEA y (▲) CRL libre. En todos los casos se incubaron, 2 mL de una suspensión de CLEAs con 30-40  $\mu\text{g}$  de proteína/mL ó 2 mL de suspensión (1:10) de cada derivado en una mezcla 50:50 etanol/amortiguador fosfatos 25 mM pH 7 a 25°C. La actividad residual se midió con pNPB como sustrato. Los símbolos representan el valor promedio de dos ensayos independientes  $\pm$  desviación estándar.

Por otro lado, los derivados como la naftil-CLR y el BrCN-CRL mantuvieron entre 30 y 40% de su actividad residual después de 97 h con un comportamiento similar al de la enzima libre, por lo que dichos soportes no tuvieron un marcado efecto estabilizante. Así mismo, los derivados de la CRL inmovilizados por adsorción como los octil-CRL y MANAE-CRL, presentaron incluso una menor estabilidad que la enzima libre.

Dado que el mayor efecto estabilizante frente al etanol, fue obtenido con el amino-CLEA, se probó la estabilidad de dicho derivado en otro solvente polar, el metanol (40%). Dicho derivado logró mantener el 70% de su actividad inicial después de 23 h de incubación en presencia de este solvente, mientras que la enzima libre sólo retuvo el 20% en el mismo tiempo de tratamiento (datos no mostrados).

Posteriormente, se determinó la estabilidad de los derivados de la CRL en presencia de un solvente orgánico no polar, el ciclohexano (50%). Dicho solvente fue elegido ya que se empleó como medio de reacción para una reacción modelo estudiada (ver sección 9.7). La CRL libre se vio rápida y totalmente inactivada en 5 h de tratamiento, mientras que todos los derivados presentaron un marcado efecto estabilizante (Fig. 69).



**Figura 69.** Estabilidad de la CLR y de sus diferentes derivados inmovilizados sobre soportes de agarosa en presencia de ciclohexano. (■) Glioxil-CRL, (●) GA-CRL, (◊) BrCN-CRL, (■) MANAE-CRL, (●) Octil-CRL, (◆) Naftil-CRL, (■) Carboxi-CLEA, (●) Amino-CLEA y (▲) CRL libre. En todos los casos se incubaron, 2 mL de una suspensión de CLEAs con 30-40  $\mu\text{g}$  de proteína/mL ó 2 mL de suspensión (1:10) de cada derivado en una mezcla bifásica 50:50 ciclohexano/amortiguador fosfatos 25 mM pH 7 a 25°C. La actividad residual se midió con *p*NPB como sustrato. Los símbolos representan el valor promedio de dos ensayos independientes  $\pm$  desviación estándar.

Contrario a lo observado con etanol, en ciclohexano, los derivados más estables fueron aquellos preparados por adsorción. Entre ellos, los de adsorción hidrofóbica mostraron incluso un fenómeno de hiperactivación. Con las naftil-CRL y octil-CRL se logró recuperar el 320 y 257% de la actividad inicial, respectivamente, después de 100 h de incubación en dicho solvente. El efecto activador observado se explica en términos de activación interfacial en presencia del sistema bifásico solvente-agar, en donde además, el solvente no polar estabiliza las interacciones hidrofóbicas enzima-soporte. Este fenómeno también fue reportado por Pizarro y colaboradores (Pizarro *et al.*, 2012) quienes estudiaron la estabilidad de la octil-CRL en ciclohexano y hexano (1000% y >600% de actividad residual a las 120 h, respectivamente), sin embargo en comparación con los resultados obtenidos en este trabajo, el efecto activador fue 3 veces menor. Dichas discrepancias pueden explicarse en las diferencias entre las cargas enzimáticas empleadas durante la preparación de los derivados de la CRL en ambos trabajos. Por otro lado, con los derivados glioxil-CRL, GA-CRL, carboxi- y amino-CLEA, se tuvo un efecto estabilizante que logró mantener en todos los casos más del 100% de la actividad inicial durante todo el tratamiento. Los CLEAs no mostraron un fuerte efecto de activación, mientras que los otros dos derivados sí lo presentaron. De manera que nuevamente observamos como la presencia de PEI en los derivados sin soporte (CLEAs), logra disminuir el contacto de los solventes no polares con

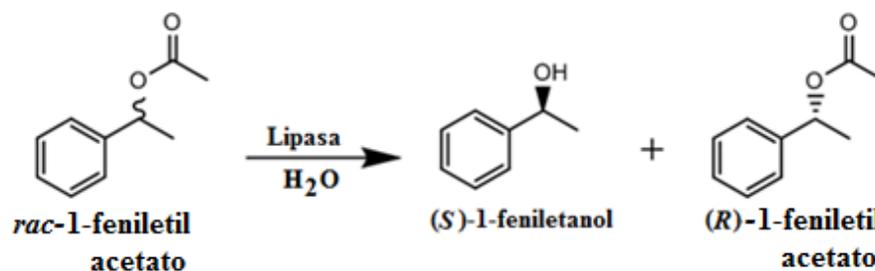
la enzima, en donde se logró mantener la actividad inicial casi inalterada en presencia de ciclohexano. En cambio, en los otros soportes (glioxil- y GA-agarosa) los derivados mostraron un fenómeno de activación ya que el solvente tiene mayor contacto con la enzima.

## 9.6. Modulación de la enantioselectividad de la CRL y sus derivados inmovilizados

Dada la importancia de la enantioselectividad dentro de las propiedades catalíticas de las lipasas, se llevó a cabo el estudio de la modificación de la selectividad de los derivados inmovilizados de la CRL en dos reacciones modelo. Además de las diferentes orientaciones logradas con los distintos soportes probados, el empleo de la ingeniería del medio de reacción y las modificaciones químicas de dichos derivados fue usada en conjunto para lograr al menos un biocatalizador que mostrara una enantioselectividad suficiente para una posible aplicación industrial ( $E > 20$ ) (Bornscheuer & Kazlauskas, 2006b).

### 9.6.1. Hidrólisis enantioselectiva del 1-feniletil acetato (FEA)

Dentro de los compuestos enantiopuros de interés industrial, los alcoholes quirales tienen un papel importante durante la síntesis de compuestos farmacéuticos, así como también en la industria de saborizantes y aromatizantes para alimentos (Ni & Xu, 2012; Wu & Xiao, 2007). Por ello, se estudió la enantioselectividad de los derivados de la CRL en la resolución del (*S*)-1-feniletanol a partir de la hidrólisis del 1-feniletil acetato racémico (*rac*-FEA) (Fig. 70).



**Figura 70.** Hidrólisis enantioselectiva del 1-feniletil acetato racémico para la resolución del (*S*)-1-feniletanol catalizada por lipasas.

La primera parte consistió en la evaluación del efecto del pH en la resolución del (*S*)-1-feniletanol con los diferentes derivados de la CRL (Tabla 16). Como tendencia general, todos los derivados presentaron mayor preferencia hacia la hidrólisis del enantiómero *S* del sustrato. Así mismo, todos los derivados tuvieron mayor actividad a pH 7 que a pH 5 (en promedio 3.6 veces

más). Este resultado puede explicarse ya que en otros reportes se ha encontrado que la CRL presenta una actividad óptima a un pH = 6.5, manteniendo el 80% de esta actividad máxima a pH 7, mientras que a pH 5 tan sólo presenta alrededor del 55% de la actividad obtenida a pH 6.5 (Ozturk, 2001). Así mismo, en la mayoría de los derivados la enantioselectividad fue mayor a pH 7 que a pH 5 (Tabla 16). Sin embargo, los valores de  $E$  alcanzados a pH 7 no fueron mayores a 20 en ninguno de los casos probados.

**Tabla 16.** Efecto del pH y el tipo de inmovilización en la reacción de hidrólisis del *rac*-1-FEA catalizada por los derivados inmovilizados de la CRL.

Derivados	pH 5		pH 7	
	Actividad específica (U/g)	$E^1$ (S)	Actividad específica (U/g)	$E^1$ (S)
carboxi-CLEA	24 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	161 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>
amino-CLEA	13 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>	20 <sup>b</sup>	6 <sup>a</sup>
BrCN	85 <sup>c</sup>	8 <sup>b</sup>	277 <sup>c</sup>	6 <sup>a</sup>
GA	41 <sup>d</sup>	9 <sup>b</sup>	56 <sup>d</sup>	12 <sup>b</sup>
glioxil	39 <sup>d</sup>	ND	176 <sup>e</sup>	6 <sup>a</sup>
octil	242 <sup>e</sup>	1 <sup>a</sup>	752 <sup>f</sup>	7 <sup>a</sup>
naftil	11 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	45 <sup>g</sup>	6 <sup>a</sup>
MANAE	133 <sup>f</sup>	8 <sup>b</sup>	602 <sup>h</sup>	10 <sup>b</sup>

Las condiciones de reacción fueron *rac*-1-FEA 5 mM en amortiguador 10 mM (acetatos y Tris, pH 5 y pH 7, respectivamente) a 25°C. ND = no determinado. <sup>1</sup> $E$  fue calculado del coeficiente de las tasas de reacción de (*S*)-1-feniletanol/(*R*)-1-feniletanol. <sup>a,b,c,d,e,f,g,h</sup> Los valores con distintas letras son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ). Los valores presentados son el promedio de dos ensayos independientes.

Posteriormente, haciendo uso de la ingeniería del medio de reacción, se evaluó el efecto de la temperatura (4°C) y la adición de un co-solvente (acetonitrilo) en la enantioselectividad resultante de los derivados de la CRL (Tabla 17). El efecto obtenido al disminuir la temperatura de 25°C a 4°C fue muy marcado en cuanto a la actividad de los biocatalizadores, ya que en todos los casos su actividad disminuyó entre 10 y 60 veces. Además, la enantioselectividad se vio poco mejorada en ambas temperaturas, ya que en algunos casos se obtuvieron valores de  $E$  iguales ( $E$  de los derivados carboxi-CLEA, amino-CLEA, BrCN-CRL y glioxil-CRL, sin diferencia significativa con  $P < 0.05$ ), habiendo casos en donde la  $E$  fue menor a 4°C que a 25°C. Dicha disminución en la actividad se explica ya que la temperatura óptima de actividad de la CRL se encuentra alrededor de los 30-35°C (Ozturk, 2001). Sin embargo, a pesar de que la disminución de la temperatura no reportó mejoras en la enantioselectividad, fue necesario mantener esta baja

temperatura al probar la adición de acetonitrilo al medio de reacción. La actividad de los derivados de la CRL a pH 7, 4°C y en presencia de acetonitrilo al 30%, resultó aún menor que a 4°C (Tabla 17). Sin embargo, al llevar a cabo la reacción en las mismas condiciones pero a 25°C la actividad fue muy similar, con la desventaja de que no se obtuvo mejora en la selectividad (datos no mostrados). Por el contrario, la enantioselectividad de los derivados en estas condiciones a 4°C se vio incrementada de una manera muy marcada. En este caso, se obtuvieron 5 derivados con una  $E > 20$ , alcanzando una  $E$  máxima  $> 200$  con el derivado MANAE-CRL.

**Tabla 17.** Efecto de la temperatura y la adición de co-solvente en la hidrólisis del *rac*-1-FEA catalizada por los derivados inmovilizados de la CRL.

Derivados	4°C		4°C, acetonitrilo (30%)	
	Actividad específica (U/g)	$E^1$ (S)	Actividad específica (U/g)	$E^1$ (S)
carboxi-CLEA	2 <sup>a,b</sup>	6 <sup>a</sup>	0.1 <sup>b</sup>	14 <sup>a</sup>
amino-CLEA	2 <sup>a,b</sup>	5 <sup>a</sup>	0.05 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>
BrCN	5 <sup>d</sup>	7 <sup>a,b</sup>	0.4 <sup>d</sup>	41 <sup>e</sup>
GA	1 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a,b</sup>	19 <sup>b</sup>
glioxil	2 <sup>a,b</sup>	6 <sup>a</sup>	0.1 <sup>b</sup>	27 <sup>c</sup>
octil	19 <sup>e</sup>	10 <sup>c</sup>	0.3 <sup>c</sup>	34 <sup>d</sup>
naftil	3 <sup>b,c</sup>	8 <sup>b,c</sup>	0.1 <sup>b</sup>	106 <sup>f</sup>
MANAE	4 <sup>c,d</sup>	5 <sup>a</sup>	0.5 <sup>e</sup>	>200 <sup>g</sup>

Las condiciones de reacción fueron *rac*-FEA 5 mM en amortiguador Tris (10 mM, pH 7). <sup>1</sup> $E$  fue calculado del coeficiente de las tasas de reacción de (*S*)-1-feniletanol/(*R*)-1-feniletanol. <sup>a,b,c,d,e,f,g</sup> Los valores con distintas letras son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ). Los valores presentados son el promedio de dos ensayos independientes.

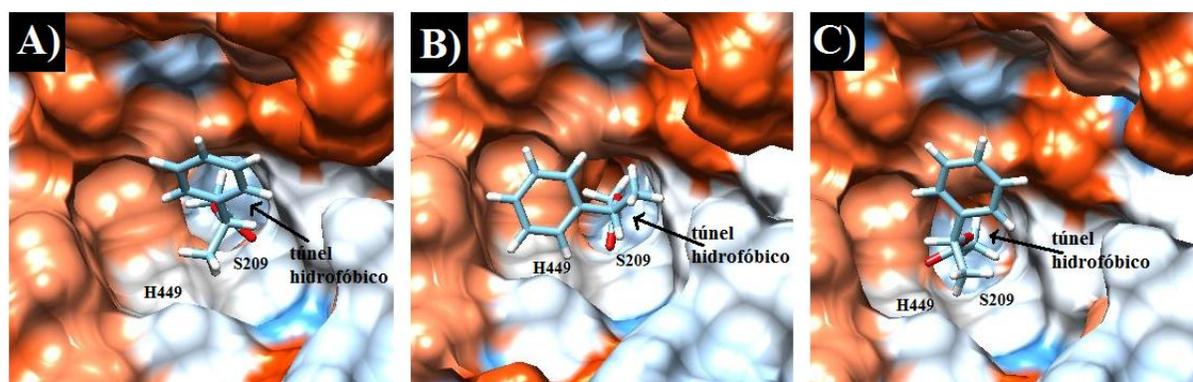
La marcada disminución de la actividad enzimática en presencia del co-solvente puede estar ligada tanto a cambios conformacionales de la enzima, como a la disminución de la desolvatación del sustrato (mayor energía de activación para formar el complejo enzima-sustrato), así como también a la disminución de la flexibilidad enzimática y a la desestabilización de complejo enzima-sustrato debida a la menor solvatación del intermediario tetraédrico formado (Klibanov, 1997; Klibanov, 2001). Por otro lado, la presencia de solventes orgánicos es un factor importante en la enantioselectividad de las enzimas. Sin embargo, no se ha encontrado una correlación entre alguna propiedad del solvente (log  $P$  o la constante dieléctrica) que pueda ayudar a predecir una mayor enantioselectividad (Carrea *et al.*, 1995). A pesar de ello, se pueden lograr resultados mejorados mediante la prueba de varios solventes para una reacción en

específico con una enzima determinada, como lo fue en este caso. Los derivados que menos modificaron su enantioselectividad por la adición de acetonitrilo fueron ambos CLEAs (Tabla 17). Sin embargo, también estos derivados incrementaron su enantioselectividad en presencia de este co-solvente, aunque de una manera menos marcada en comparación con los otros derivados. Nuevamente, este resultado puede explicarse gracias al microambiente de cargas positivas alrededor de ambos CLEAs que disminuye el contacto del solvente con la enzima, resultando en una menor modificación de la enantioselectividad. En contraste, la actividad de los CLEAs también sufrió una marcada disminución en presencia del co-solvente, al igual que los demás derivados en soportes. Esta baja en actividad de los CLEAs, puede atribuirse a una mayor solubilidad del sustrato en el medio de reacción al adicionar el co-solvente, con la consecuente disminución de la formación del complejo enzima-sustrato.

Así mismo, en presencia de acetonitrilo, los derivados en soportes de unión covalente, mostraron menor modificación de la enantioselectividad que los de adsorción hidrofóbica ó iónica (Tabla 17). Dentro de los derivados de unión covalente, aquel con mayor modificación de su enantioselectividad fue el derivado BrCN-CRL cuya unión química unipuntual es la más débil en comparación con los otros dos derivados (glixil- y GA-CRL). Por lo tanto, podemos concluir que los derivados con mayor grado de unión al soporte (mayor número de enlaces enzima-soporte) son menos susceptibles a los cambios conformacionales generados por la presencia de agentes distorsionantes, como el acetonitrilo en este caso.

Por otro lado, los derivados preparados en soportes por adsorción presentaron el mayor efecto en la modificación de su enantioselectividad. Entre ellos, la MANAE-CRL y la naftil-CRL exhibieron una enantioselectividad muy alta ( $E > 100$ ). Los modelos de unión de menor energía de los enantiómeros del FEA al sitio catalítico de la CRL, muestran una diferencia en la orientación del anillo del sustrato (Fig. 71). En el (*S*)-FEA el anillo está orientado en la misma dirección del túnel hidrofóbico de la enzima haciendo que el sustrato adopte una conformación más alineada con la forma del bolsillo catalítico (Fig. 71, A). Mientras que en el (*R*)-FEA el anillo se orienta hacia uno de los lados de la cavidad hidrofóbica lo que hace que el sustrato adopte una conformación desalineada con dicha estructura (Fig. 71, B). Por lo tanto, un cambio en la forma y tamaño de este bolsillo catalítico, así como diferencias en la solubilidad del sustrato, pueden favorecer más la unión enzima-sustrato para uno de los dos enantiómeros. En este caso, una reducción en el tamaño del bolsillo catalítico causada por la presencia del acetonitrilo, provocaría un desplazamiento de la selectividad a favor de la formación del

complejo (*S*)-FEA-enzima cuyo ajuste es más estable ya que presenta menor energía que el (*R*)-FEA forzado a orientarse en una conformación similar (Fig. 71, C). Por este motivo, quizá el derivado MANAE-CRL sufra el mayor grado de reducción del espacio del sitio catalítico debido a una mayor compactación de la enzima en presencia del acetonitrilo. En comparación con el derivado naftil-CRL, en éste último la enzima también sufre una gran compactación en presencia del acetonitrilo, pero en menor grado que en el MANAE-CRL. Esto podría explicarse ya que en la naftil-CRL la enzima sufre un proceso de apertura de la tapa por interacciones hidrofóbicas enzima-soporte, lo que podría estar estabilizando de mayor manera la forma abierta del bolsillo catalítico disminuyendo la compactación sufrida en comparación con la MANAE-CRL.

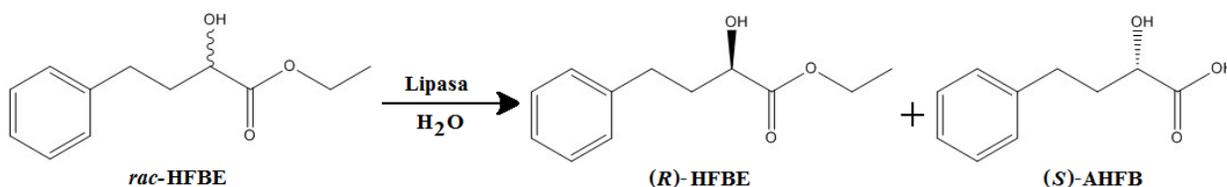


**Figura 71.** Modos de unión al sitio catalítico de la CRL para los enantiómeros del FEA sugeridos por modelamiento molecular realizado en el servidor SwissDock (<http://www.swissdock.com.ch/>). Se empleó la estructura 3D de la CRL con código PDB 1CRL. A) (*S*)-FEA con  $\Delta G = -6.03$  Kcal/mol, B) (*R*)-FEA con  $\Delta G = -6.15$ , y C) (*R*)-FEA con  $\Delta G = -5.84$  Kcal/mol. En naranja y azul las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas de la enzima, respectivamente. Dos de los residuos de la triada catalítica en negro (serina 209 e histidina 449). Los modelos A y B representan el modo de unión de menor energía. Los datos y la visualización de los ajustes fueron obtenidos mediante el programa UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

### 9.6.2. Hidrólisis enantioselectiva del 2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo (HFBE)

Otra de las reacciones de resolución enantiomérica estudiadas fue la resolución del (*R*)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo (*R*-HFBE) a partir de la hidrólisis de la mezcla racémica del mismo compuesto (*rac*-HFBE) (Fig. 72). Dicho sustrato fue seleccionado como modelo de estudio ya que los  $\alpha$ -hidroxiácidos ópticamente puros son unidades estructurales de una gran variedad de compuestos quirales de interés industrial (Green *et al.*, 2009). Tal es el caso del (*R*)-HFBE que se emplea en la síntesis de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (Iwasaki *et al.*, 1989), tales como el enalapril, benazepril, cilazapril, ramipril y quinapril, que

tienen aplicaciones en el tratamiento de la hipertensión y el tratamiento de deficiencias cardiacas (Oda *et al.*, 1998).



**Figura 72.** Hidrólisis enantioselectiva del *rac*-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo para la resolución del (*R*)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo catalizada por lipasas.

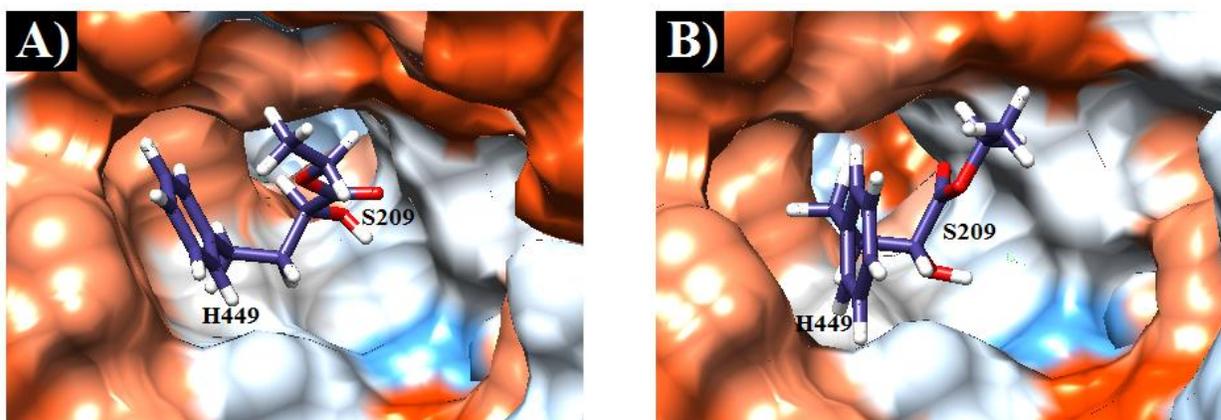
Como primera etapa, se estudió el efecto de las condiciones del medio de reacción, comenzando por la evaluación del efecto del pH en la enantioselectividad y actividad de los derivados de la CRL (Tabla 18). Con todos los derivados probados, se encontró una mayor preferencia hacia la hidrólisis del isómero *S* del sustrato, sin embargo, no fue muy marcada ( $E_{\max}$  pH 7 < 4 y  $E_{\max}$  pH 5 < 9). En cuanto a la actividad, en 5 de los derivados se encontró mayor actividad a pH 7 que a pH 5. Al igual que en la reacción anterior, dicho efecto puede explicarse a la mayor actividad que presenta la CRL a pH 7. Sin embargo, con los derivados MANAE-CRL y GA-CRL (soportes aminados), la actividad fue mayor a pH 5 que a pH 7. Estos resultados podrían estar atribuidos a una interacción menos intensa entre la enzima y el soporte ya que en estos soportes la mayoría de los puentes salinos entre carboxilos de la enzima y aminos del soporte se podrían romper a pH 5. Esto resultaría en una enzima con menor grado de rigidificación y por lo tanto presenta mayor actividad.

**Tabla 18.** Efecto del pH y el tipo de inmovilización en la reacción de hidrólisis del *rac*-HFBE catalizada por los derivados inmovilizados de la CRL.

Derivados	pH 7		pH 5	
	Actividad específica (U/g)	$E^1$ (S)	Actividad específica (U/g)	$E^1$ (S)
carboxi-CLEA	76 <sup>a</sup>	3 <sup>a,b</sup>	63 <sup>c</sup>	8 <sup>b</sup>
amino-CLEA	ND	ND	11 <sup>a</sup>	6 <sup>a,b</sup>
BrCN	161 <sup>d</sup>	3 <sup>a,b</sup>	302 <sup>g</sup>	7 <sup>a,b</sup>
GA	90 <sup>b</sup>	3 <sup>a,b</sup>	132 <sup>d</sup>	6 <sup>a,b</sup>
glioxil	171 <sup>e</sup>	2 <sup>a</sup>	65 <sup>c</sup>	8 <sup>b</sup>
octil	529 <sup>f</sup>	4 <sup>b</sup>	293 <sup>f</sup>	4 <sup>a</sup>
naftil	131 <sup>c</sup>	2 <sup>a</sup>	22 <sup>b</sup>	9 <sup>b</sup>
MANAE	80 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	173 <sup>e</sup>	7 <sup>a,b</sup>

Las condiciones de reacción fueron *rac*-HFBE 5 mM en amortiguador 10 mM (acetatos y fosfatos, pH 5 y pH 7, respectivamente) a 25°C. ND = no determinado. <sup>1</sup> $E$  fue calculado del coeficiente de las tasas de reacción de (S)-HFBE/(R)-HFBE. <sup>a,b,c,d,e,f,g</sup> Los valores con distintas letras son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ). Los valores presentados son el promedio de dos ensayos independientes.

Sin embargo, a pesar de que la mayoría de los derivados presentaron mayor actividad a pH 7 que a pH 5, se observó el efecto contrario en la enantioselectividad. Es decir que, todos los derivados de la CRL mostraron mayor enantioselectividad a pH 5 que a pH 7 (sólo con la octil-CRL no se observó cambio en la  $E$ ). Esto puede explicarse ya que a pH 5 la polaridad del medio es mayor que a pH 7 (amortiguador de acetatos pK 9.25, amortiguador fosfatos pK 6.8-7.2) lo que disminuye la solubilidad del anillo del sustrato *rac*-HFBE en el medio de reacción. Dicho suceso, favorece la interacción hidrofóbica del anillo del sustrato y la cavidad hidrofóbica del sitio activo, cuyos modelamientos moleculares sugieren que se encuentra mejor estabilizada para el enantiómero (S)-HFBE cuya energía del complejo enzima-sustrato es menor que la del (R)-HFBE (Fig. 73). No obstante, este cambio en la selectividad de la enzima no fue muy marcado (en promedio se obtuvo una  $E$  3 veces mayor), y en ninguno de los casos se logró obtener un valor de  $E > 20$ .



**Figura 73.** Modos de unión al sitio catalítico de la CRL para los enantiómeros del HFBE sugeridos por modelamiento molecular realizado por el servidor SwissDock (<http://www.swissdock.com.ch/>). Para el modelamiento se empleó la estructura 3D de la CRL con código PDB 1CRL. A) (*S*)-HFBE con  $\Delta G = -6.26$  Kcal/mol, y B) (*R*)-HFBE con  $\Delta G = -6.23$  Kcal/mol. En naranja y azul las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas de la enzima, respectivamente. Ambos modelos representan el modo de unión de menor energía. Los datos de energía y la visualización de los ajustes fueron obtenidos mediante el programa UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

Posteriormente, se evaluó el efecto de la temperatura y la adición de un co-solvente (Tabla 19). La disminución de la temperatura de 25°C a 4°C provocó una menor actividad específica en todos los derivados, siendo en promedio 4 veces menor. Sin embargo, en este caso, se observó un ligero aumento de la enantioselectividad a esta baja temperatura, que en promedio logró aumentar la *E* en 1.2 veces. Como ya se ha mencionado a lo largo de este trabajo, la rigidificación de la estructura de una enzima puede favorecer la enantioselectividad. Este efecto puede obtenerse mediante la disminución de la temperatura, ya que logra que las moléculas de la enzima presenten menor movimiento y sean más rígidas. Sin embargo, en nuestro caso particular de estudio, la disminución de la temperatura mejoró la *E* pero no logró que alguno de los biocatalizadores tuviera una *E* > 20. Por este motivo, nuevamente se adicionó un co-solvente para mejorar la enantioselectividad obtenida anteriormente (Tabla 19).

**Tabla 19.** Efecto de la temperatura y la adición de co-solvente en la reacción de hidrólisis del *rac*-HFBE catalizada por los derivados inmovilizados de la CRL.

Derivados	4°C		4°C, acetonitrilo (30%)	
	Actividad específica (U/g)	$E^1$ (S)	Actividad específica (U/g)	$E^1$ (S)
carboxi-CLEA	9.5 <sup>b</sup>	10 <sup>c</sup>	1.3 <sup>b,c</sup>	39 <sup>e</sup>
amino-CLEA	1.5 <sup>a</sup>	6 <sup>a,b</sup>	1.1 <sup>b</sup>	18 <sup>d</sup>
BrCN	87 <sup>f</sup>	8 <sup>a,b,c</sup>	2.0 <sup>c</sup>	12 <sup>b,c</sup>
GA	35 <sup>d</sup>	9 <sup>b,c</sup>	3.1 <sup>d</sup>	14 <sup>c,d</sup>
glioxil	16 <sup>c</sup>	11 <sup>c</sup>	0.4 <sup>a</sup>	9 <sup>b</sup>
octil	87 <sup>f</sup>	5 <sup>a</sup>	4.3 <sup>e</sup>	4 <sup>a</sup>
naftil	7 <sup>b</sup>	8 <sup>a,b,c</sup>	0.9 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>
MANAE	49 <sup>e</sup>	9 <sup>b,c</sup>	1.1 <sup>b</sup>	3 <sup>a</sup>

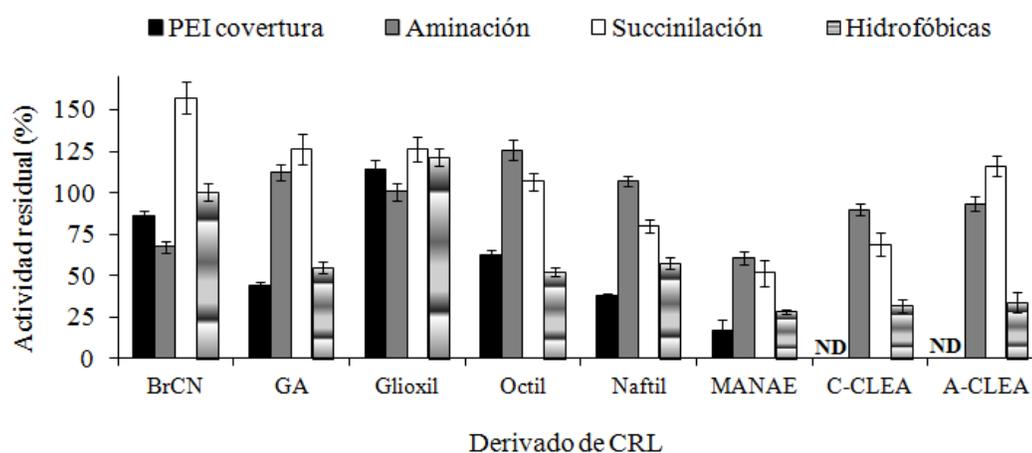
Las condiciones de reacción fueron *rac*-HFBE 5 mM en amortiguador acetatos (10 mM, pH 5). <sup>1</sup> $E$  fue calculado del coeficiente de las tasas de reacción de (S)-HFBE/(R)-HFBE. <sup>a,b,c,d,e,f</sup> Los valores con distintas letras son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ). Los valores presentados son el promedio de dos ensayos independientes.

La presencia de acetonitrilo en el medio de reacción, nuevamente disminuyó la actividad de todos los derivados (Tabla 19). Además, la enantioselectividad de los derivados glioxil-, octil-, naftil- y MANAE-CRL fue menor en presencia que en ausencia del co-solvente. Solamente con los derivados BrCN-, GA-CRL y ambos CLEAs se obtuvo una mayor  $E$  al adicionar el acetonitrilo. Los derivados que mostraron mayor enantioselectividad al adicionar acetonitrilo, fueron los CLEAs, alcanzando una  $E$  máxima = 39 con el carboxi-CLEA. El cambio en enantioselectividad logrado con los CLEAs puede estar ligado a dos efectos: 1) los cambios conformacionales del sitio catalítico, resultado de una combinación entre la inmovilización de la enzima en forma de carboxi-CLEA y las condiciones de reacción probadas (4°C y 30% de acetonitrilo), y 2) el microambiente de cargas positivas alrededor de la enzima proporcionado por la PEI. Para responder a éstas hipótesis, se estudió la hidrólisis enantioselectiva del *rac*-HFBE con derivados inmovilizados de la CRL los cuales fueron sometidos a modificaciones químicas ó físicas. Dichas modificaciones se realizaron con el objetivo de tener derivados que además de estar inmovilizados en una orientación particular, presentaran diferencias en densidad y tipo de carga, así como en hidrofobicidad e hidrofiliidad. Dichos cambios podrían provocar la modificación de la selectividad enzimática en la reacción de estudio.

Las modificaciones químicas que se realizaron fueron: aminación (aumento de las cargas positivas en la superficie de la enzima), succinilación (aumento de las cargas negativas en la

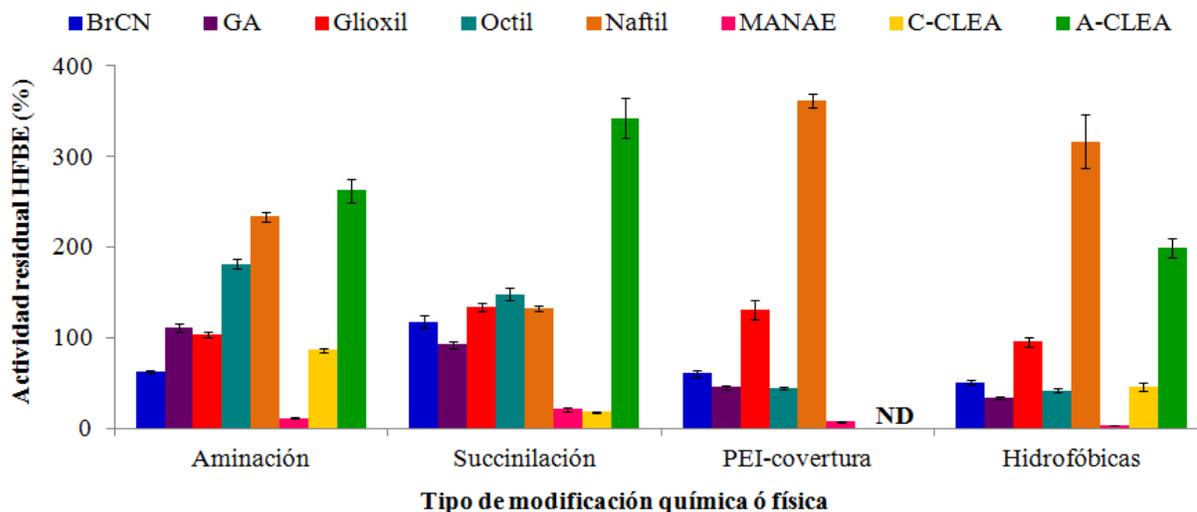
superficie de la enzima) y adición de cadenas alifáticas (aumento de la hidrofobicidad de la superficie de la enzima). La modificación física consistió en el recubrimiento de los derivados con PEI (aumento de la hidrofiliidad del microambiente de la enzima), sin embargo esta modificación química no se realizó para los CLEAs dado que éstos ya presentan este recubrimiento.

Primero se evaluó la actividad residual de los derivados modificados determinando la actividad hidrolítica con *p*NPB como sustrato (Fig. 74). El efecto de las modificaciones sobre los derivados en soportes por inmovilización covalente mostró tener menos impacto en el derivado glioxil-CRL, el cual mantuvo más del 100% de actividad residual en todos los casos, con un aumento máximo del 25% de la inicial cuando fue succinilado. Así mismo, los derivados GA- y BrCN-CRL mostraron la mayor actividad residual tras el tratamiento de succinilación incluso mostrando un efecto activador (157% y 127% de actividad residual con BrCN-CRL y GA-CRL, respectivamente). Por otro lado, los derivados en soportes por adsorción, mostraron mayor actividad residual tras la aminación, resultando en un efecto activador con los derivados inmovilizados por adsorción hidrofóbica (126% y 108%, octil- y naftil-CRL, respectivamente), mientras que el MANAE-CRL sólo mantuvo el 61% de actividad residual. En cuanto a los derivados inmovilizados en forma de CLEAs, se observó una marcada disminución de la actividad residual después de la adición de cadenas alifáticas, mientras que la aminación y la succinilación permitieron la obtención de derivados con la mayor actividad residual.



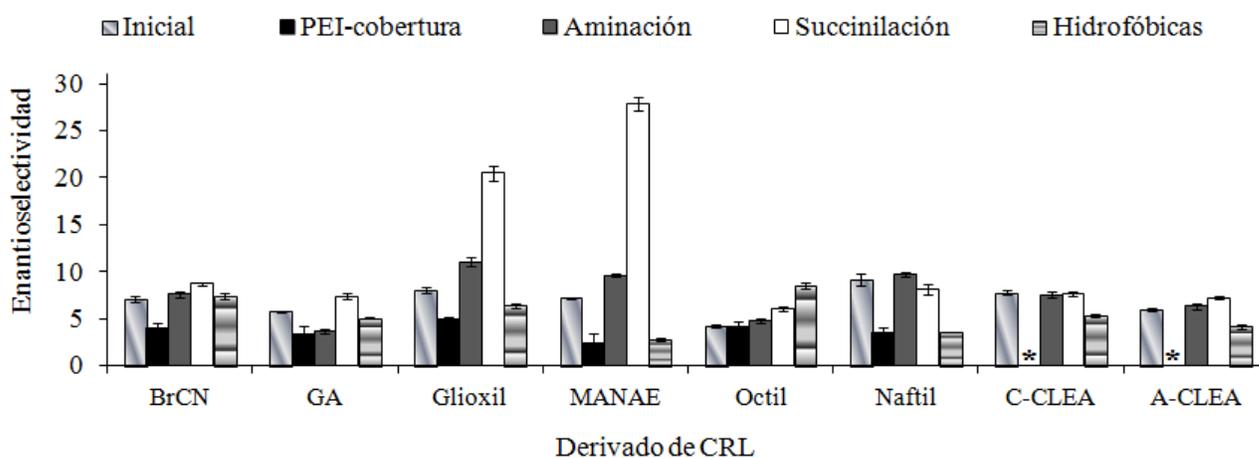
**Figura 74.** Efecto de la modificación física ó química en la actividad residual de los derivados de la CRL. \*No determinado. En todos los casos la actividad fue medida empleando *p*NPB como sustrato.

Posteriormente, se probaron los derivados modificados en la hidrólisis enantioselectiva del *rac*-HFBE (Fig. 75). Como condiciones de reacción se seleccionaron un pH 5 y una temperatura de 25°C, ya que la disminución de la temperatura y la adición de acetonitrilo no mostraron una marcada mejora en la enantioselectividad de los derivados en soportes, además de que a 25°C se obtuvo una mayor actividad. Los resultados obtenidos mostraron una tendencia general en donde aquellas modificaciones en las que la mayoría de los derivados tuvieron menor actividad residual fueron la adición de cadenas alifáticas y el recubrimiento con PEI. Sin embargo, el derivado naftil-CRL mostró una marcada hiperactivación tras la cobertura con PEI, alcanzando una actividad residual de 360% sobre el *rac*-HFBE. Con respecto a los demás derivados, únicamente la glioxil-CRL mantuvo más del 100% de actividad residual, mientras que todos los demás disminuyeron su actividad al estar recubiertos con PEI. Una tendencia similar se observó con el efecto de la adición de cadenas alifáticas, en donde nuevamente se observó una marcada hiperactivación del derivado naftil-CRL (317% actividad residual), así como también para el amino-CLEA (200% actividad residual). Los demás derivados mostraron una actividad residual menor al 100%, con la más alta para el caso de la glioxil-CRL que mantuvo el 96% de su actividad inicial. De estos resultados, nuevamente se puede notar que el derivado glioxil-CRL fue el menos afectado a los tratamientos sometidos, ya que su actividad residual medida con ambos sustratos (*p*NPB y *rac*-HFBE), en todos los casos fue muy cercana al 100% de la inicial.



**Figura 75.** Efecto de la modificación física ó química en la actividad de los derivados de la CRL sobre *rac*-HFBE. ND: No determinado. En todos los casos la actividad fue medida empleando 5 mM *rac*-HFBE como sustrato, pH 5 y 25°C.

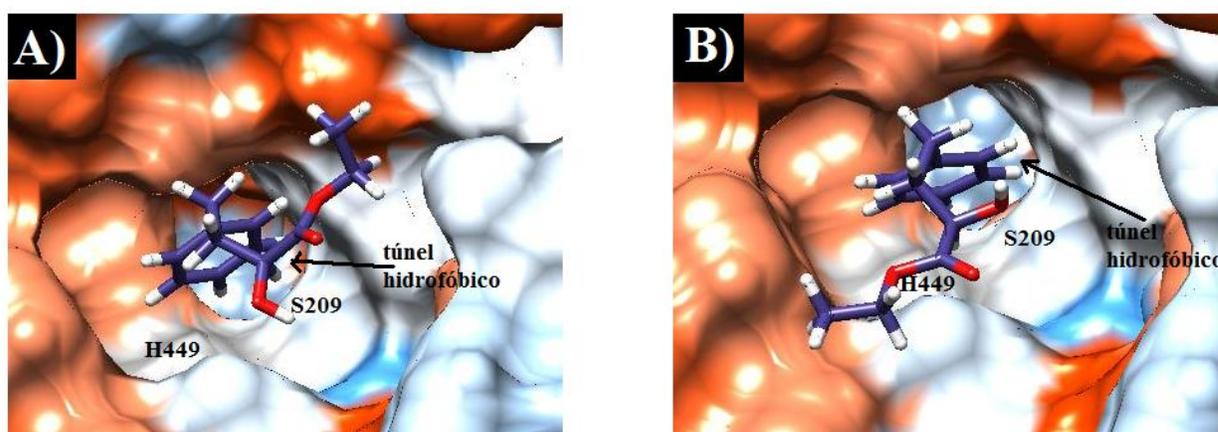
En cuanto a la selectividad de los biocatalizadores modificados, en la gran mayoría de ellos no se logró un notable cambio en la selectividad ya que casi todos los valores de  $E$  de los derivados modificados fueron menores a 10 (Fig.76). Sin embargo, los derivados glioxil-CRL-succinilado y MANAE-CRL-succinilado lograron expresar una  $E > 20$ . Por lo tanto, la mejora en la enantioselectividad del carboxi-CLEA sin modificaciones químicas ( $E = 39$ , anteriormente lograda a 4°C y adición de 30% acetonitrilo) está mejor explicada por un cambio en la conformación del sitio catalítico de la enzima debido a su entrecruzamiento y a las condiciones del medio de reacción. Por lo que dicha mejora no está tan ligada exclusivamente a la presencia del microambiente de cargas positivas proporcionadas por la PEI. Lo anterior se refuerza ya que todos los derivados modificados con un recubrimiento de PEI no mostraron una mejora en su enantioselectividad, incluso en la mayoría de los casos la  $E$  fue menor en presencia del microambiente de cargas positivas que en su ausencia (Fig. 76).



**Figura 76.** Efecto de la modificación física ó química en la enantioselectividad de los derivados de la CRL. \*No determinado. En todos los casos la actividad fue medida empleando 5 mM *rac*-HFBE como sustrato, pH 5 y 25°C. La enantioselectividad ( $E$ ) en todos los casos fue calculado del coeficiente de las tasas de reacción de (*S*)-HFBE/(*R*)-HFBE.

La mejora en la selectividad de los derivados succinilados de glioxil- y MANAE-CRL, podría estar relacionada con un aumento de la interacción hidrofóbica del anillo del sustrato HFBE con la cavidad hidrofóbica de la enzima. De los modelos de unión enzima-sustrato de menor energía en donde el anillo de ambos enantiómeros del HFBE se encuentra orientado hacia el túnel hidrofóbico (orientación inducida por el aumento de la polaridad de la superficie de la enzima succinilada), se puede sugerir que el enantiómero (*S*)-HFBE unido con dicha orientación, es más favorable que el (*R*)-HFBE ya que a pesar de que presentan casi la misma energía, el

enantiómero (*S*)-HFBE tiene mayor espacio para acomodar la parte del donador de acilo que el (*R*)-HFBE que orienta esta misma parte de la molécula hacia el lado contrario de la cavidad (Fig. 77). Dicha interacción es el resultado de dos efectos combinados: 1) la conformación enzimática resultante de su inmovilización en estos dos tipos de soporte, sumado a 2) un aumento en la densidad de cargas negativas de su superficie de la enzima succinilada. Lo anterior se refuerza ya que la mejora en la selectividad de los glioxil-CRL-succinilado y MANAE-CRL-succinilado no se puede explicar exclusivamente al efecto del tratamiento químico de los derivados ya que con los demás biocatalizadores no se observó un marcado aumento entre los valores de  $E$  con derivados sin succinilar y los mismos succinilados.

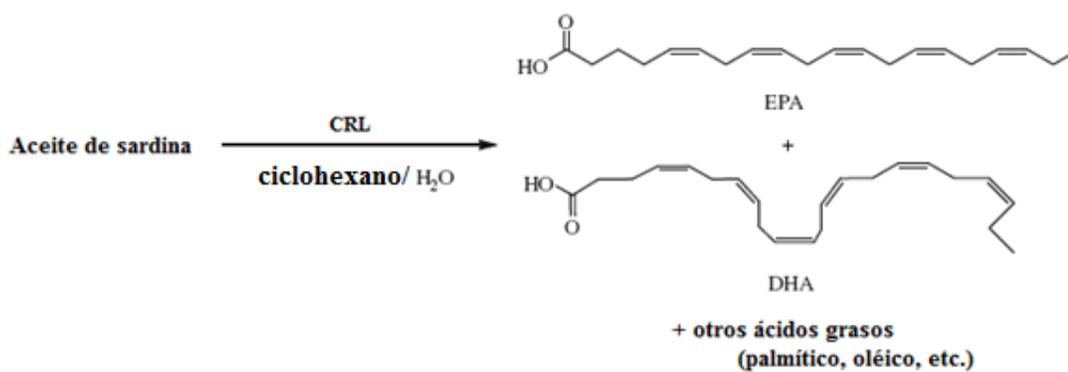


**Figura 77.** Modos de unión al sitio catalítico de la CRL para los enantiómeros del HFBE sugeridos por modelamiento molecular realizado por el servidor SwissDock (<http://www.swissdock.com.ch/>). Para el modelamiento se empleó la estructura 3D de la CRL con código PDB 1CRL. A) (*S*)-HFBE con  $\Delta G = -5.58$  Kcal/mol, y B) (*R*)-HFBE con  $\Delta G = -5.57$  Kcal/mol. En naranja y azul las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas de la enzima, respectivamente. Ambos modelos representan el modo de unión de menor energía en el cual el anillo del sustrato está orientado hacia el túnel hidrofóbico. Los datos de energía y la visualización de los ajustes fueron obtenidos mediante el programa UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

Por otra parte, a pesar de que el MANAE-CRL-succinilado ( $E = 28$ ) fue más enantioselectivo que el glioxil-CRL-succinilado ( $E = 21$ ), el segundo mostró una actividad hacia el *rac*-HFBE 6.3 veces mayor que el primero, mientras que la mejora en enantioselectividad no fue tan marcada. Por lo tanto, el biocatalizador glioxil-CRL-succinilado presenta mayores ventajas que los demás biocatalizadores probados para la resolución del (*R*)-HFBE, además de que dicho derivado se encuentra inmovilizado en un soporte por unión covalente que le provee una intensa unión multipuntual que mostró importantes mejoras en estabilidad térmica y en presencia de solventes.

### 9.7. Aplicación de los derivados de la CRL en la hidrólisis del aceite de sardina

Las lipasas presentan una gran variedad de aplicaciones en la hidrólisis y síntesis de sus sustratos naturales, los triglicéridos (Ferreira-Dias *et al.*, 2013). Por su especificidad sobre la posición (regioselectividad) y el tipo de ácido graso (acilselectividad), se han empleado en la construcción de lípidos estructurados (Bornscheuer, 2013; Kourist *et al.*, 2010; Osborn & Akoh, 2002) y en la purificación de ácidos grasos (Rubio-Rodríguez *et al.*, 2010). Por lo tanto, la búsqueda y mejora continua de la actividad y selectividad de las lipasas empleadas en este tipo de aplicaciones ha tomado gran importancia. Por este motivo, se evaluó la selectividad de los diferentes derivados inmovilizados de la CRL en la hidrólisis de sustratos de este tipo. Como reacción modelo de estudio se seleccionó la hidrólisis del aceite de sardina (Fig. 78). Este aceite se caracteriza por tener una alta composición de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), dentro de los cuales contiene alrededor de un 30% de ácido eicosapentaenóico (EPA) y ácido docosahexaenóico (DHA) (Fernandez-Lorente *et al.*, 2011). La importancia de dichos ácidos grasos radica en que además de ser esenciales para el humano, el EPA y el DHA se han adicionado a su dieta logrando beneficios como la prevención de enfermedades cardiovasculares, diabetes, hipertensión y artritis (Simopoulos, 2011; Simopoulos, 1991; Speranza & Macedo, 2012). Dada su composición, el aceite de sardina puede emplearse como fuente de obtención de PUFAs así como también para la evaluación de la selectividad EPA/DHA de las lipasas (Fernández-Lorente *et al.*, 2011b). Este tipo de selectividad permite conocer si la lipasa presenta preferencia sobre alguno de estos dos ácidos grasos. Aquellos biocatalizadores que poseen una alta selectividad EPA/DHA pueden emplearse exitosamente en la obtención de aceites enriquecidos en un tipo particular de PUFA (Akanbi *et al.*, 2013; Kahveci & Xu, 2011; Ma *et al.*, 2014; Martín Valverde *et al.*, 2012).



**Figura 78.** Liberación de PUFAs mediante la hidrólisis del aceite de sardina catalizada por la CRL (Fernández-Lorente *et al.*, 2012).

Para medir la selectividad EPA/DHA durante la hidrólisis del aceite de sardina se fijó un porcentaje de hidrólisis menor al 5% en todos los casos (Fernández-Lorente *et al.*, 2012). Dicho porcentaje se alcanzó en menos de 24 h con todos los biocatalizadores probados (datos no mostrados). Los derivados más activos fueron aquellos inmovilizados en soportes por adsorción (Tabla 20), dentro de los cuales el de mayor actividad fue el naftil-CRL. Los derivados menos activos fueron aquellos inmovilizados por unión covalente en forma de CLEAs y sobre los soportes glioxil-, GA- y BrCN-agarosa. Con estos resultados se vuelve a evidenciar la hiperactivación de los derivados inmovilizados por adsorción hidrofóbica, comparada con el derivado BrCN-CRL que presenta la forma más parecida a la enzima libre y que también ha sido reportado por otros autores (Fernández-Lorente *et al.*, 2011a). Por otro lado, el marcado efecto en la reducción de la actividad de los derivados por unión covalente es explicada por una mayor rigidificación de la estructura de la enzima, dicho efecto concuerda con lo reportado por otros investigadores quienes obtuvieron menor actividad con el derivado de la CRL inmovilizado en glioxil-agarosa durante la hidrólisis del mismo aceite (Pizarro *et al.*, 2012).

**Tabla 20.** Selectividad de los derivados inmovilizados de la CRL en la hidrólisis del aceite de sardina

Tipo de inmovilización	Derivado CRL	Actividad específica <sup>1</sup> (U/mg)	Selectividad <sup>2</sup>
Sin soporte (CLEAs)	carboxi	0.09 <sup>a</sup>	9.7 <sup>f</sup>
	amino	0.11 <sup>a</sup>	6.2 <sup>e</sup>
En soporte de agarosa	BrCN	0.07 <sup>a</sup>	4.3 <sup>d</sup>
	GA	0.48 <sup>b</sup>	2.0 <sup>a</sup>
	glioxil	0.02 <sup>a</sup>	2.9 <sup>b</sup>
	octil	1.70 <sup>c</sup>	3.5 <sup>b,c</sup>
	naftil	4.20 <sup>d</sup>	3.7 <sup>c,d</sup>
	MANAE	2.00 <sup>c</sup>	3.6 <sup>b,c,d</sup>

<sup>1</sup>La actividad específica fue expresada como la suma de EPA + DHA ( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$ ). <sup>2</sup>La selectividad se definió como el cociente EPA/DHA. Los valores representan el promedio de dos ensayos independientes  $\pm$  desviación estándar. <sup>a,b,c,d,e</sup>Las medias con letra diferente son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Cabe mencionar que la CRL presenta una baja regioselectividad, por lo que es capaz de hidrolizar indistintamente los enlaces éster de las tres posiciones de un triglicérido; sin embargo posee una gran acilselectividad hacia una marcada preferencia en la hidrólisis de ácidos grasos saturados y monosaturados (Kahveci *et al.*, 2010). En cuanto a la selectividad EPA/DHA todos

los derivados de la CRL presentaron mayor preferencia por el EPA que por el DHA (Tabla 20). Esta preferencia también ha sido reportada por otros autores (Fernández-Lorente *et al.*, 2011a; Pizarro *et al.*, 2012; Tanaka *et al.*, 1993). Se ha encontrado que esta menor preferencia por el DHA se debe a un mayor impedimento estérico de las dobles ligaduras en forma *cis* que caracterizan a este PUFA (Kahveci & Xu, 2011; Okada & Morrissey, 2007).

Por otro lado, las selectividades EPA/DHA obtenidas con los biocatalizadores inmovilizados en soportes fueron en todos los casos menores a la obtenida con el derivado BrCN-CRL (Tabla 20). Sorprendentemente se logró una marcada modificación de la selectividad EPA/DHA con aquellos derivados de la CRL inmovilizados en forma de CLEAs (2.3 veces mayor con el carboxi-CLEA en comparación con el BrCN-CRL). Nuevamente, este cambio podría estar relacionado con cambios en la conformación del sitio catalítico de la enzima debidos al entrecruzamiento en forma de CLEAs y también a la presencia del microambiente con cargas positivas alrededor de la enzima. Estos resultados concuerdan con otro trabajo en donde se estudió este tipo de selectividad con las lipasas de TLL, CALB y RML que fueron inmovilizadas en octil-agarosa y posteriormente recubiertas con PEI. Dicho recubrimiento logró que los derivados presentaran una mayor selectividad en presencia de este polímero (Fernández-Lorente *et al.*, 2012).

# 10. CONCLUSIONES

---

## Generales

- Se desarrolló un protocolo de preparación de CLEAs entrecruzados con polietileniminas vía la activación de sus grupos carboxilo con EDC-NHS.
- Mediante la mezcla de técnicas de inmovilización de enzimas, la ingeniería del medio de reacción y la modificación química de la enzima, se obtuvieron biocatalizadores de la CRL que presentaron una alta enantioselectividad tanto en la resolución del (*S*)-1-feniletanol ( $E > 200$ ) como en la del (*R*)-HFBE ( $E > 20$ ).

## Particulares

- La baja actividad recuperada al preparar carboxi-CLEAs de la CRL (15%) puede atribuirse a la desestabilización de la conformación activa de la enzima debida al entrecruzamiento de sus grupos carboxilo y no a un efecto causado por el entrecruzamiento de una conformación inactiva de la enzima por presencia del solvente empleado.
- Las lipasas probadas en el presente trabajo inmovilizadas en forma de CLEAs a través de sus grupos carboxilo, logran expresar alrededor del 22-26% de la actividad inmovilizada.
- Con la adición de trioctanoína a una concentración de 0.28 mM, se logró recuperar CRL-CLEAs con el doble de actividad que en ausencia de dicho sustrato.
- Los mejores carboxi-CLEAs mostraron ventajas sobre la enzima libre, tales como mayor termoestabilidad y enantioselectividad.
- El tamaño del agente de entrecruzamiento y la adición de BSA, mostraron tener un marcado efecto en la morfología, actividad específica, termoestabilidad y enantioselectividad de los CLEAs.
- Los carboxi-CLEAs fueron más activos (1.3 veces) y termoestables (3.2 veces) que los amino-CLEAs y ambos alcanzaron el mismo exceso enantiomérico (91%) en la resolución del (*S*)-ácido mandélico.
- El acetonitrilo mostró la mayor capacidad precipitante de la CRL logrando insolubilizarla el 100% de la enzima a concentraciones mayores al 60% v/v, causando un daño máximo del 15% en la actividad enzimática recuperada.
- Mediante técnicas de inmovilización, se logró la estabilización de la CRL frente a la temperatura. El derivado más termoestable obtenido, glioxil-CRL, mantuvo el 87% de su actividad por 150 h bajo incubación a 50°C y pH 7.

- El efecto termoestabilizante obtenido por entrecruzamiento de enzimas (CLEAs), es comparable al logrado con soportes de unión covalente multipuntual como los soportes GA-agarosa; con la ventaja de que los primeros no requieren el empleo de un soporte.
- La inmovilización covalente de la CRL permitió la estabilización de la enzima en presencia de solventes polares como el etanol al 40%. Los derivados de la CRL en forma de amino-CLEAs, glioxil-CRL y GA-CRL presentaron una buena estabilización de la enzima frente al etanol, manteniendo del 50 al 60% de su actividad inicial por 97 h en contacto con dicho solvente. Mientras que los derivados inmovilizados por adsorción, presentaron un efecto estabilizante menor, y en algunos casos peor estabilidad que la enzima libre.
- Se mejoró la estabilidad de la CRL en presencia de solventes no polares como el ciclohexano mediante su inmovilización con y sin soporte. Con los soportes de adsorción hidrofóbica, la enzima presentó una activación (300 a 250%, después de 100 h de incubación en dicho solvente), mientras que con los CRL-CLEAs la enzima mantuvo su actividad inicial casi sin modificarse durante el tiempo del ensayo.
- La combinación de la inmovilización de enzimas y la ingeniería del medio de reacción, permitieron la obtención de derivados de la CRL con una  $E > 100$  en la resolución del (*S*)-1-feniletanol catalizada por los derivados inmovilizados en MANAE- y naftil-agarosa.
- La combinación de técnicas de inmovilización de enzimas y su modificación química, permitió la obtención de biocatalizadores enantioselectivos para la resolución del (*R*)-HFBE en la que se logró una  $E = 21$  con el derivado de la CRL inmovilizado en glioxil-agarosa y succinilado.
- La inmovilización de la CRL en forma de CLEAs permitió la obtención de biocatalizadores con una alta selectividad EPA/DHA ( $= 9.7$ ) durante la hidrólisis del aceite de sardina.

# 11. REFERENCIAS

- Adlercreutz, P. **2013**. Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chem. Soc. Rev.*, 42(15), 6406-6436.
- Afach, G., Kawanami, Y., Cheetangdee, N., Fukada, K., Izumori, K. **2008**. Lipase-Catalyzed Synthesis of d- Psicose Fatty Acid Diesters and their Emulsification Activities. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(8), 755-760.
- Ahmed, S., Kazlauskas, R.J., Morinville, A., Grochulski, P., Schrag, J.D., Cygler, M. **1994**. Enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase toward carboxylic acids: A predictive rule from substrate mapping and X-ray crystallography. *Biocatalysis*, 9, 209-225.
- Akanbi, T.O., Adcock, J.L., Barrow, C.J. **2013**. Selective concentration of EPA and DHA using *Thermomyces lanuginosus* lipase is due to fatty acid selectivity and not regioselectivity. *Food Chem.*, 138(1), 615-620.
- Akoh, C., Min, D., Weete, J. **2008**. Microbial lipases. in: *Food Lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*, (Eds.) C. Akoh, D. Min, Taylor and Francis Group. United States of America, pp. 767-806.
- Akoh, C.C., Lee, G.C., Shaw, J.F. **2004**. Protein engineering and applications of *Candida rugosa* lipase isoforms. *Lipids*, 39(6), 513-526.
- Ali, Y.B., Verger, R., Abousalham, A. **2012**. Lipases or esterases: Does it really matter? toward a new bio-physico-chemical classification, Vol. 861, pp. 31-51.
- Andualema, B., Gessesse, A. **2012**. Microbial lipases and their industrial applications: Review. *Biotechnology*, 11(3), 100-118.
- Armisen, P., Mateo, C., Cortés, E., Barredo, J.L., Salto, F., Diez, B., Rodés, L., García, J.L., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. **1999**. Selective adsorption of poly-His tagged glutaryl acylase on tailor-made metal chelate supports. *J. Chromatogr.*, 848(1-2), 61-70.
- Arsenault, A., Cabana, H., Jones, J.P. **2011**. Laccase-based CLEAs: Chitosan as a novel cross-linking agent. *Enzyme Research*, 2011(1), art. no. 376015.
- Aytar, B.S., Bakir, U. **2008**. Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates. *Process Biochem.*, 43(2), 125-131.
- Bartczak, D., Kanaras, A.G. **2011**. Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot EDC/Sulfo-NHS coupling. *Langmuir*, 27(16), 10119-10123.
- Bassani, G., Farruggia, B., Picó, G. **2011**. Cationic polyelectrolytes-lipases complexes formation as tool for recovery of these enzymes from their natural sources. *Int. J. Biol. Macromol.*, 49(3), 351-355.
- Bassani, G., Fuciños, P., Picó, G., Farruggia, B. **2010**. *Candida rugosa* lipase Lip1-polyethyleneglycol interaction and the relation with its partition in aqueous two-phase systems. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 75(2), 532-537.
- Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Fernández-Lafuente, R., Huguet, J., Guisán, J.M. **1998**. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol. Bioeng.*, 58(5), 486-493.
- Bektaş, I., Yucel, S., Ustun, G., Aksoy, H.A. **2008**. Production of reduced calorie structured lipid by acidolysis of tripalmitin with capric acid: Optimisation by response surface methodology. *J. Sci. Food Agric.*, 88(11), 1927-1931.
- Berglund, P. **2001**. Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. *Biomol. Eng.*, 18(1), 13-22.
- Berglund, P., Holmquist, M., Hult, K. **1998**. Reversed enantiopreference of *Candida rugosa* lipase supports different modes of binding enantiomers of a chiral acyl donor. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 5(1-4), 283-287.
- Berglund, P., Holmquist, M., Hult, K., Hogberg, H.E. **1995**. Alcohols as enantioselective inhibitors in a lipase catalysed esterification of a chiral acyl donor. *Biotechnol. Lett.*, 17(1), 55-60.

- Berglund, P., Hult, K. **2000**. Biocatalytic synthesis of enantiopure compounds using lipases. in: *Stereoselective biocatalysis*, (Eds.) R.N. Patel, N. Ramesh, Marcel Dekker. New York, pp. 633-635.
- Berglund, P., Vallikivi, I., Fransson, L., Dannacher, H., Holmquist, M., Martinelle, M., Björkling, F., Parve, O., Hult, K. **1999**. Switched enantiopreference of *Humicola* lipase for 2-phenoxyalkanoic acid ester homologs can be rationalized by different substrate binding modes. *Tetrahedron Asymmetry*, 10(21), 4191-4202.
- Berglund, P., Vorde, C., Hogberg, H.-E. **1994**. Esterification of 2-Methylalkanoic Acids Catalyzed By Lipase From *Candida rugosa* - Enantioselectivity as a Function of Water Activity and Alcohol Chain-Length. *Biocatalysis*, 9, 123-130.
- Betancor, L., López-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Mateo, G.D.-O.C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. **2006**. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme Microb. Technol.*, 39(4), 877-882.
- Bianchi, D., Battistel, E., Bosetti, A., Cesit, P., Fekete, Z. **1993**. Effects of chemical modification on stereoselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Tetrahedron Asymmetry*, 4(5), 777-782.
- Bolivar, J.M. **2009**. Ingeniería de procesos red-ox catalizados por enzimas: diseño de nuevos catalizadores inmovilizados para la regeneración *in situ* de cofactores PhD Thesis. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España, pp. 612.
- Bommarius, A.S., Paye, M.F. **2013**. Stabilizing biocatalysts. *Chem. Soc. Rev.*, 42(15), 6534-6565.
- Bornscheuer, U., Kazlauskas, R.J. **2006a**. Choosing Reaction Media: Water and Organic Solvents. 2nd ed. in: *Hydrolases in Organic Synthesis, Regio- and Stereoselective Biotransformations*, (Eds.) U. Bornscheuer, R.J. Kazlauskas, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim, Germany, pp. 25-42.
- Bornscheuer, U., Kazlauskas, R.J. **2006b**. Designing Enantioselective Reactions. 2nd ed. in: *Hydrolases in Organic Synthesis, Regio- and Stereoselective Biotransformations*, (Eds.) U. Bornscheuer, R.J. Kazlauskas, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim, Germany, pp. 5-24.
- Bornscheuer, U., Kazlauskas, R.J. **2006c**. Lipases and Esterases. 2nd ed. in: *Hydrolases in Organic Synthesis, Regio- and Stereoselective Biotransformations*, (Eds.) U. Bornscheuer, R.J. Kazlauskas, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim, Germany, pp. 61-185.
- Bornscheuer, U.T. **2013**. Enzymes in lipid modification: From classical biocatalysis with commercial enzymes to advanced protein engineering tools. *OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides*, 20(1), 45-49.
- Bornscheuer, U.T. **2002a**. Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13(6), 543-547.
- Bornscheuer, U.T. **2002b**. Microbial carboxyl esterases: Classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26(1), 73-81.
- Bornscheuer, U.T., Huisman, G.W., Kazlauskas, R.J., Lutz, S., Moore, J.C., Robins, K. **2012**. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*, 484(7397), 185-194.
- Botta, M., Cernia, E., Corelli, F., Manetti, F., Soro, S. **1997**. Probing the substrate specificity for lipases. II. Kinetic and modeling studies on the molecular recognition of 2-arylpropionic esters by *Candida rugosa* and *Rhizomucor miehei* lipases. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1337(2), 302-310.
- Bovara, R., Carrea, G., Ottolina, G., Riva, S. **1993**. Water activity does not influence the enantioselectivity of lipase PS and lipoprotein lipase in organic solvents. *Biotechnol. Lett.*, 15(2), 169-174.

- Bradford, M.M. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1-2), 248-254.
- Brady, D., Jordaan, J. **2009**. Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol. Lett.*, 31(11), 1639-1650.
- Brady, D., Steenkamp, L., Skein, E., Chaplin, J.A., Reddy, S. **2004**. Optimisation of the enantioselective biocatalytic hydrolysis of naproxen ethyl ester using ChiroCLEC-CR. *Enzyme Microb. Technol.*, 34(3-4), 283-291.
- Braiuca, P., Ebert, C., Basso, A., Linda, P., Gardossi, L. **2006**. Computational methods to rationalize experimental strategies in biocatalysis. *Trends Biotechnol.*, 24(9), 419-425.
- Brockman, H.L., Law, J.H., Kezdy, F.J. **1973**. Catalysis by adsorbed enzymes. The hydrolysis of tripropionin by pancreatic lipase adsorbed to siliconized glass beads. *J. Biol. Chem.*, 248(14), 4965-4970.
- Broos, J., Visser, A.J.W.G., Engbersen, J.F.J., Verboom, W., Van Hoek, A., Reinhoudt, D.N. **1995**. Flexibility of enzymes suspended in organic solvents probed by time-resolved fluorescence anisotropy. Evidence that enzyme activity and enantioselectivity are directly related to enzyme flexibility. *J. Am. Chem. Soc.*, 117(51), X-12663.
- Brzozowski, A.M., Derewenda, U., Derewenda, Z.S., Dodson, G.G., Lawson, D.M., Turkenburg, J.P., Bjorkling, F., Hugel-Jensen, B., Patkar, S.A., Thim, L. **1991**. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*, 351(6326), 491-494.
- Cabana, H., Jones, J.P., Agathos, S.N. **2007**. Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. *J. Biotechnol.*, 132(1), 23-31.
- Cabrera, Z., Fernandez-Lorente, G., Fernandez-Lafuente, R., Palomo, J.M., Guisan, J.M. **2009**. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 57(1-4), 171-176.
- Cabrera, Z., Gutarra, M.L.E., Guisan, J.M., Palomo, J.M. **2010**. Highly enantioselective biocatalysts by coating immobilized lipases with polyethyleneimine. *Catal. Commun.*, 11(11), 964-967.
- Cao, L. **2006a**. Adsorption-based Immobilization. in: *Carrier-bound immobilized enzymes, Principles, Applications and Design*, (Ed.) L. Cao, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. The Netherlands, pp. 54-145.
- Cao, L. **2006b**. Covalent Enzyme Immobilization. in: *Carrier-bound immobilized enzymes, Principles, Applications and Design*, (Ed.) L. Cao, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. The Netherlands, pp. 169-293.
- Cao, L. **2006c**. Enzyme Entrapment. in: *Carrier-bound immobilized enzymes, Principles, Applications and Design*, (Ed.) L. Cao, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. The Netherlands, pp. 317-379.
- Cao, L. **2006d**. Introduction: Immobilized Enzymes: Past, Present and Prospects. in: *Carrier-bound immobilized enzymes, Principles, Applications and Design*, (Ed.) L. Cao, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. The Netherlands, pp. 1-37.
- Cao, L., van Langen, L., Sheldon, R.A. **2003**. Immobilised enzymes: Carrier-bound or carrier-free? *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14(4), 387-394.
- Cao, L., Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A. **2000**. Cross-linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Org. Lett.*, 2(10), 1361-1364.
- Carraway, K.L., Spoerl, P., Koshland Jr, D.E. **1969**. Carboxyl group modification in chymotrypsin and chymotrypsinogen. *J. Mol. Biol.*, 42(1), 133-137.
- Carrea, G., Ottolina, G., Riva, S. **1995**. Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. *Trends Biotechnol.*, 13(2), 63-70.

- Carrera, G., Riva, S. **2008**. *Organic synthesis with enzymes in non-aqueous media*. Weinheim Wiley-VCH, Milán, Italia.
- Carrillo-Munoz, J.R., Bouvet, D., Guibé-Jampel, E., Loupy, A., Petit, A. **1996**. Microwave-promoted lipase-catalyzed reactions. Resolution of ( $\pm$ )-1-phenylethanol. *J. Org. Chem.*, 61(22), 7746-7749.
- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G., Marty, A. **2012**. Lipases: An overview. in: *Methods Mol. Biol.*, Vol. 861, pp. 3-30.
- Cooper, C.L., Dubin, P.L., Kayitmazer, A.B., Turksen, S. **2005**. Polyelectrolyte-protein complexes. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 10(1-2), 52-78.
- Cruz, J., Barbosa, O., Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R., Torres, R., Ortiz, C. **2012**. Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 80, 7-14.
- Cygler, M., Grochulski, P., Kazlauskas, R.J., Schrag, J.D., Bouthillier, F., Rubin, B., Serreqi, A.N., Gupta, A.K. **1994**. A structural basis for the chiral preference of lipases. *J. Am. Chem. Soc.*, 116(8), 3180-3186.
- Chahiniana, H., Sarda, L. **2009**. Distinction between Esterases and lipases: Comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases. *Protein and Peptide Letters*, 16(10), 1149-1161.
- Chang, S.W., Yang, C.J., Chen, F.Y., Akoh, C.C., Shieh, C.J. **2009**. Optimized synthesis of lipase-catalyzed l-ascorbyl laurate by Novozym® 435. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 56(1), 7-12.
- Chen, C.S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G., Sih, C.J. **1982**. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.*, 104(25), 7294-7299.
- Chmura, A., Rustler, S., Paravidino, M., van Rantwijk, F., Stolz, A., Sheldon, R.A. **2013**. The combi-CLEA approach: enzymatic cascade synthesis of enantiomerically pure (S)-mandelic acid. *Tetrahedron: Asymmetry*, 24(19), 1225-1232.
- Christakopoulos, P., Kourentzi, E., Hatzinikolaou, D.G., Claeysens, M., Kekos, D., Macris, B.J. **1998**. Enhancement of pH-stability of a low molecular mass endoglucanase from *Fusarium oxysporum* by protein pegylation. *Carbohydr. Res.*, 314(1-2), 95-99.
- Christopher, L.P., Hemanathan, K., Zambare, V.P. **2014**. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *Applied Energy*, 119, 497-520.
- Dave, R., Madamwar, D. **2010**. Preparations for the use of *Candida rugosa* lipase in non-conventional solvents. *Biocatal. Biotransform.*, 28(3), 157-166.
- Derewenda, U., Brzozowski, A.M., Lawson, D.M., Derewenda, Z.S. **1992**. Catalysis at the interface: The anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry®*, 31(5), 1532-1541.
- Derewenda, Z.S., Sharp, A.M. **1993**. News from the interface: The molecular structures of triacylglyceride lipases. *Trends Biochem. Sci.*, 18(1), 20-25.
- Domínguez De María, P., Sánchez-Montero, J.M., Sinisterra, J.V., Alcántara, A.R. **2006**. Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnol. Adv.*, 24(2), 180-196.
- Dong, T., Zhao, L., Huang, Y., Tan, X. **2010**. Preparation of cross-linked aggregates of aminoacylase from *Aspergillus melleus* by using bovine serum albumin as an inert additive. *Bioresour. Technol.*, 101(16), 6569-6571.
- El-Adawy, T.A. **2000**. Functional properties and nutritional quality of acetylated and succinylated mung bean protein isolate. *Food Chem.*, 70(1), 83-91.
- Fágáin, C.Ó. **1995**. Understanding and increasing protein stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1252(1), 1-14.
- Fernandez-Lafuente, R., Armisén, P., Sabuquillo, P., Fernández-Lorente, G., Guisán, J.M. **1998**. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chem. Phys. Lipids*, 93(1-2), 185-197.

- Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C.M., Rodriguez, V., Santana, C., Soler, G., Bastida, A., Guisán, J.M. **1993**. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme Microb. Technol.*, 15(7), 546-550.
- Fernández-Lorente, G., Betancor, L., Carrascosa, A.V., Guisán, J.M. **2011a**. Release of omega-3 fatty acids by the hydrolysis of fish oil catalyzed by lipases immobilized on hydrophobic supports. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 88(8), 1173-1178.
- Fernández-Lorente, G., Betancor, L., Carrascosa, A.V., Palomo, J.M., Guisan, J.M. **2012**. Modulation of the selectivity of immobilized lipases by chemical and physical modifications: Release of omega-3 fatty acids from fish oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 89(1), 97-102.
- Fernandez-Lorente, G., Cabrera, Z., Godoy, C., Fernandez-Lafuente, R., Palomo, J.M., Guisan, J.M. **2008**. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. *Process Biochem.*, 43(10), 1061-1067.
- Fernandez-Lorente, G., Filice, M., Lopez-Vela, D., Pizarro, C., Wilson, L., Betancor, L., Avila, Y., Guisan, J.M. **2011**. Cross-linking of lipases adsorbed on hydrophobic supports: Highly selective hydrolysis of fish oil catalyzed by RML. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(6), 801-807.
- Fernández-Lorente, G., Ortiz, C., Segura, R.L., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M., Palomo, J.M. **2005**. Purification of different lipases from *Aspergillus niger* by using a highly selective adsorption on hydrophobic supports. *Biotechnol. Bioeng.*, 92(6), 773-779.
- Fernández-Lorente, G., Pizarro, C., López-Vela, D., Betancor, L., Carrascosa, A.V., Pessela, B., Guisan, J.M. **2011b**. Hydrolysis of fish oil by lipases immobilized inside porous supports. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(6), 819-826.
- Fernández-Lorente, G., Terreni, M., Mateo, C., Bastida, A., Fernández-Lafuente, R., Dalmases, P., Huguet, J., Guisán, J.M. **2001**. Modulation of lipase properties in macro-aqueous systems by controlled enzyme immobilization: Enantioselective hydrolysis of a chiral ester by immobilized *Pseudomonas* lipase. *Enzyme Microb. Technol.*, 28(4-5), 389-396.
- Ferreira-Dias, S., Sandoval, G., Plou, F., Valero, F. **2013**. The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. in: *Electron. J. Biotechnol.*, Vol. 16.
- Ferrer, P., Montesinos, J.L., Valero, F., Solà, C. **2001**. Production of native and recombinant lipases by *Candida rugosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 95(3), 221-255.
- Filho, M., Pessela, B.C., Mateo, C., Carrascosa, A.V., Fernandez-Lafuente, R., Guisán, J.M. **2008**. Reversible immobilization of a hexameric  $\alpha$ -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 on polymeric ionic exchangers. *Process Biochem.*, 43(10), 1142-1146.
- Fishman, A., Cogan, U. **2003**. Bio-imprinting of lipases with fatty acids. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 22(3-4), 193-202.
- Fitzpatrick, P.A., Steinmetz, A.C.U., Ringe, D., Klivanov, A.M. **1993**. Enzyme crystal structure in a neat organic solvent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90(18), 8653-8657.
- Ford, J., Yang, S. **2007**. Directed synthesis of silica nanoparticles on micropatterned hydrogel templates tethered with poly(ethyleneimine). *Chem. Mater.*, 19(23), 5570-5575.
- Foresti, M.L., Alimenti, G.A., Ferreira, M.L. **2005**. Interfacial activation and bioimprinting of *Candida rugosa* lipase immobilized on polypropylene: effect on the enzymatic activity in solvent-free ethyl oleate synthesis. *Enzyme Microb. Technol.*, 36(2-3), 338-349.
- Franco, T.T., Andrews, A.T., Asenjo, J.A. **1996**. Conservative chemical modification of proteins to study the effects of a single protein property on partitioning in aqueous two-phase systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 49(3), 290-299.

- Franssen, M.C.R., Jongejan, H., Kooijman, H., Spek, A.L., Camacho Mondril, N.L.F.L., Boavida Dos Santos, P.M.A.C., De Groot, A. **1996**. Resolution of a tetrahydrofuran ester by *Candida rugosa* lipase (CRL) and an examination of CRL's stereochemical preference in organic media. *Tetrahedron Asymmetry*, 7(2), 497-510.
- Fuentes, M., Maquiese, J.V., Pessela, B.C.C., Abian, O., Fernández-Lafuente, R., Mateo, C., Guisán, J.M. **2004**. New Cationic Exchanger Support for Reversible Immobilization of Proteins. *Biotechnol. Prog.*, 20(1), 284-288.
- Galvis, M., Barbosa, O., Ruiz, M., Cruz, J., Ortiz, C., Torres, R., Fernandez-Lafuente, R. **2012**. Chemical amination of lipase B from *Candida antarctica* is an efficient solution for the preparation of crosslinked enzyme aggregates. *Process Biochem.*, 47(12), 2373-2378.
- García-García, M.I., Sola-Carvajal, A., Sánchez-Carrón, G., García-Carmona, F., Sánchez-Ferrer, Á. **2011**. New stabilized FastPrep-CLEAs for sialic acid synthesis. *Bioresour. Technol.*, 102(10), 6186-6191.
- Godoy, C.A., de las Rivas, B., Bezbradica, D., Bolivar, J.M., López-Gallego, F., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M. **2011**. Reactivation of a thermostable lipase by solid phase unfolding/refolding. Effect of cysteine residues on refolding efficiency. *Enzyme Microb. Technol.*, 49(4), 388-394.
- Gotor-Fernández, V., Díaz-Rodríguez, A., Lavandera, I., Kanbak-Aksu, S., Sheldon, R.A., Gotor, V. **2012**. From diols to lactones under aerobic conditions using a laccase/TEMPO catalytic system in aqueous medium. *Adv. Synth. Catal.*, 354(18), 3405-3408.
- Grabarek, Z., Gergely, J. **1990**. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Anal. Biochem.*, 185(1), 131-135.
- Green, B.A., Yu, R.J., Van Scott, E.J. **2009**. Clinical and cosmeceutical uses of hydroxyacids. *Clin. Dermatol.*, 27(5), 495-501.
- Grochulski, P., Bouthillier, F., Kazlauskas, R.J., Serreqi, A.N., Schrag, J.D., Ziomek, E., Cygler, M. **1994a**. Analogs of reaction intermediates identify a unique substrate binding site in *Candida rugosa* lipase. *Biochemistry (Mosc)*. 33, 3490-3500.
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J.D., Cygler, M. **1994b**. Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Sci.*, 3(1), 82-91.
- Grover, P.T., Bhongle, N.N., Wald, S.A., Senanayake, C.H. **2000**. Chiral mandelic acid template provides a highly practical solution for (S)-oxybutynin synthesis. *J. Org. Chem.*, 65(19), 6283-6287.
- Guisán, J. **1988**. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme Microb. Technol.*, 10(6), 375-382.
- Guisán, J.M. **2006**. *Immobilization of enzymes and cells. Second ed.* Humana Press, New Jersey.
- Guisan, J.M., Sabuquillo, P., Fernandez-Lafuente, R., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., Halling, P.J., Kennedy, D., Miyata, E., Re, D. **2001**. Preparation of new lipases derivatives with high activity-stability in anhydrous media: adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethylenimine. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 11(4-6), 817-824.
- Gupta, A.K., Kazlauskas, R.J. **1993**. Substrate modification to increase the enantioselectivity of hydrolases. A route to optically-active cyclic allylic alcohols. *Tetrahedron Asymmetry*, 4(5), 879-888.
- Gupta, P., Dutt, K., Misra, S., Raghuvanshi, S., Saxena, R.K. **2009**. Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosa* using glutaraldehyde. *Bioresour. Technol.*, 100(18), 4074-4076.
- Hæffner, F., Norin, T. **1999**. Molecular modelling of lipase catalysed reactions. Prediction of enantioselectivities. *Chem. Pharm. Bull.*, 47(5), 591-600.

- Hanefeld, U., Gardossi, L., Magner, E. **2009**. Understanding enzyme immobilisation. *Chem. Soc. Rev.*, 38(2), 453-468.
- Hansen, T.V., Waagen, V., Partali, V., Anthonsen, H.W., Anthonsen, T. **1995**. Co-solvent enhancement of enantioselectivity in lipase-catalysed hydrolysis of racemic esters. A process for production of homochiral C-3 building blocks using lipase B from *Candida antarctica*. *Tetrahedron Asymmetry*, 6(2), 499-504.
- Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A. **2006**. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.*, 39(2), 235-251.
- Heidt, M., Bornscheuer, U., Schmid, R.D. **1996**. Studies on the enantioselectivity in the lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerols from isopropylidene glycerol. *Biotechnol. Tech.*, 10(1), 25-30.
- Hogberg, H.E., Edlund Berglund, H.P., Hedenstrom, E. **1993**. Water activity influences enantioselectivity in a lipase-catalysed resolution by esterification in an organic solvent. *Tetrahedron Asymmetry*, 4(10), 2123-2126.
- Holmquist, M., Hæffner, F., Norin, T., Hult, K. **1996**. A structural basis for enantioselective inhibition of *Candida rugosa* lipase by long-chain aliphatic alcohols. *Protein Sci.*, 5(1), 83-88.
- Holzwarth, H.C., Pleiss, J., Schmid, R.D. **1997**. Computer-aided modelling of stereoselective triglyceride hydrolysis catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 3(1-4), 73-82.
- Illanes, A., Cauerrhff, A., Wilson, L., Castro, G.R. **2012**. Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresour. Technol.*, 115(0), 48-57.
- Iwasaki, G., Kimura, R., Numao, N., Kondo, K. **1989**. A practical and diastereoselective synthesis of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.*, 37(2), 280-283.
- Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T. **1999**. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.*, 53, 315-351.
- Jaeger, K.E., Eggert, T. **2002**. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13(4), 390-397.
- Jaeger, K.E., Reetz, M.T. **1998**. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.*, 16(9), 396-403.
- Jiang, Y., Zhang, Y., Wu, H., Li, J., Li, N., Jiang, Z. **2008**. Protamine-templated biomimetic hybrid capsules: Efficient and stable carrier for enzyme encapsulation. *Chem. Mater.*, 20(3), 1041-1048.
- Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G., Fernández-Serrano, M., García-Román, M. **2008**. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of triglycerides in o/w emulsions. Study of the initial rates and the reaction time course. *Biochem. Eng. J.*, 40(3), 473-484.
- Kahveci, D., Falkeborg, M., Gregersen, S., Xu, X. **2010**. Upgrading of Farmed Salmon Oil Through Lipase-Catalyzed Hydrolysis. *TOBIOTJ*, 4, 47-55.
- Kahveci, D., Xu, X. **2011**. Repeated hydrolysis process is effective for enrichment of omega 3 polyunsaturated fatty acids in salmon oil by *Candida rugosa* lipase. *Food Chem.*, 129(4), 1552-1558.
- Kartal, F., Janssen, M.H.A., Hollmann, F., Sheldon, R.A., Kilinc, A. **2011**. Improved esterification activity of *Candida rugosa* lipase in organic solvent by immobilization as Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 71(3-4), 85-89.
- Kartal, F., Kilinc, A. **2012**. Crosslinked aggregates of *Rhizopus oryzae* lipase as industrial biocatalysts: Preparation, optimization, characterization, and application for enantioselective resolution reactions. *Biotechnol. Prog.*, 28(4), 937-945.

- Kazlauskas, R.J., Weissfloch, A.N.E., Rappaport, A.T., Cuccia, L.A. **1991**. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. *J. Org. Chem.*, 56(8), 2656-2665.
- Ke, T., Wescott, C.R., Klibanov, A.M. **1996**. Prediction of the solvent dependence of enzymatic prochiral selectivity by means of structure-based thermodynamic calculations. *J. Am. Chem. Soc.*, 118(14), 3366-3374.
- Kennedy, J.F., Barnes, J.A., Matthews, J.B. **1983**. Mechanism of reaction of cyanogen bromide-activated agarose with amines and the solvolysis of amine ligands *British Polymer Journal*, 15(3), 133-138.
- Kim, K.K., Song, H.K., Shin, D.H., Hwang, K.Y., Sun, S.W. **1997**. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure*, 5(2), 173-185.
- Kirk, O., Christensen, M.W. **2002**. Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin. *Org. Process Res. Dev.*, 6(4), 446-451.
- Klapper, M.H. **1977**. The independent distribution of amino acid near neighbor pairs into polypeptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 78(3), 1018-1024.
- Klibanov, A. **1997**. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends Biotechnol.*, 15(3), 97-101.
- Klibanov, A.M. **2001**. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, 409(6817), 241-246.
- Klyachko, N.L., Manickam, D.S., Brynskikh, A.M., Uglanova, S.V., Li, S., Higginbotham, S.M., Bronich, T.K., Batrakova, E.V., Kabanov, A.V. **2012**. Cross-linked antioxidant nanozymes for improved delivery to CNS. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8(1), 119-129.
- Kohn, J., Wilchek, M. **1982**. Mechanism of activation of Sepharose and Sephadex by cyanogen bromide. *Enzyme Microb. Technol.*, 4(3), 161-163.
- Kouisni, L., Rochefort, D. **2009**. Confocal microscopy study of polymer microcapsules for enzyme immobilisation in paper substrates. *J. Appl. Polym. Sci.*, 111(1), 1-10.
- Kourist, R., Brundiek, H., Bornscheuer, U.T. **2010**. Protein engineering and discovery of Lipases. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 112(1), 64-74.
- Kovac, A., Scheib, H., Pleiss, J., Schmid, R.D., Paltauf, F. **2000**. Molecular basis of lipase stereoselectivity. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 102(1), 61-77.
- Kumar, A., Gross, R.A. **2000**. *Candida antarctica* lipase B-catalyzed transesterification: New synthetic routes to copolyesters. *J. Am. Chem. Soc.*, 122(48), 11767-11770.
- Kwon, D.Y., Hong, Y.J., Yoon, S.H. **2000**. Enantiomeric synthesis of (S)-2-methylbutanoic acid methyl ester, apple flavor, using lipases in organic solvent. *J. Agric. Food Chem.*, 48(2), 524-530.
- Laemmli, U.K. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lalonde, J., Margolin, A. **2002**. Immobilization of enzymes. Second ed. in: *Enzyme catalysis in organic chemistry*, (Eds.) K. Drauz, H. Waldmann, Wiley-VCH. Weinheim, pp. 163-184.
- Lampe, T.F.J., Hoffmann, H.M.R., Bornscheuer, U.T. **1996**. Lipase mediated desymmetrization of meso 2,6-di(acetoxymethyl)-tetrahydropyran-4-one derivatives. An innovative route to enantiopure 2,4,6-trifunctionalized C-glycosides. *Tetrahedron Asymmetry*, 7(10), 2889-2900.
- Lee, K.H., Lee, P.M., Siawa, Y.S. **1993**. Immobilization of aminoacylase by encapsulation in poly-L-lysine-stabilized calcium alginate beads. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 57(1), 27-32.
- López-Gallego, F. **2006**. Desarrollo de nuevos catalizadores enzimáticos para la producción directa de cefalosporinas semisintéticas a partir de cefalosporina C. PhD Thesis. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España, pp. 164.

- López-Gallego, F., Abian, O., Guisán, J.M. **2012**. Altering the interfacial activation mechanism of a lipase by solid-phase selective chemical modification. *Biochemistry (Mosc)*, 51(35), 7028-7036.
- López-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Alonso, N., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. **2005a**. Co-aggregation of enzymes and polyethyleneimine: A simple method to prepare stable and immobilized derivatives of glutaryl acylase. *Biomacromolecules*, 6(4), 1839-1842.
- López-Gallego, F., Betancor, L., Mateo, C., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Dellamora-Ortiz, G., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. **2005b**. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *J. Biotechnol.*, 119(1), 70-75.
- López-Gallego, F., Guisán, J.M., Betancor, L. **2013**. Glutaraldehyde-mediated protein immobilization, Vol. 1051, pp. 33-41.
- López-Serrano, P., Cao, L., Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A. **2002**. Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: Application to lipases. *Biotechnol. Lett.*, 24(16), 1379-1383.
- López, N., Pernas, M.A., Pastrana, L.M., Sánchez, A., Valero, F., Rúa, M.L. **2004**. Reactivity of Pure *Candida rugosa* Lipase Isoenzymes (Lip1, Lip2, and Lip3) in Aqueous and Organic Media. Influence of the Isoenzymatic Profile on the Lipase Performance in Organic Media. *Biotechnol. Prog.*, 20(1), 65-73.
- Ma, N., Hong, S.I., Zhao, T., No, D.S., Kim, C.T., Kim, Y., Kim, I.H. **2014**. Enrichment of docosahexaenoic acid from tuna oil via lipase-mediated esterification under pressurized carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids*, 87, 28-33.
- Majumder, A.B., Mondal, K., Singh, T.P., Gupta, M.N. **2008**. Designing cross-linked lipase aggregates for optimum performance as biocatalysts. *Biocatal. Biotransform.*, 26(3), 235-242.
- Margolin, A.L. **1996**. Novel crystalline catalysts. *Trends Biotechnol.*, 14(7), 223-230.
- Martín Valverde, L., González Moreno, P.A., Rodríguez Quevedo, A., Hita Peña, E., Jiménez Callejón, M.J., Esteban Cerdán, L., Molina Grima, E., Robles Medina, A. **2012**. Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) by selective alcoholysis catalyzed by lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 89(9), 1633-1645.
- Mateo, C., Abian, O., Bernedo, M., Cuenca, E., Fuentes, M., Fernandez-Lorente, G., Palomo, J.M., Grazu, V., Pessela, B.C.C., Giacomini, C., Irazoqui, G., Villarino, A., Ovsejevi, K., Batista-Viera, F., Fernandez-Lafuente, R., Guisán, J.M. **2005**. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme Microb. Technol.*, 37(4), 456-462.
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. **2000a**. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme Microb. Technol.*, 26(7), 509-515.
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. **2000b**. Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotechnol. Bioeng.*, 68(1), 98-105.
- Mateo, C., Bolivar, J.M., Godoy, C.A., Rocha-Martin, J., Pessela, B.C., Curiel, J.A., Muñoz, R., Guisan, J.M., Fernández-Lorente, G. **2010**. Improvement of enzyme properties with a two-step immobilization process on novel heterofunctional supports. *Biomacromolecules*, 11(11), 3112-3117.
- Mateo, C., Grazu, V., Pessela, B.C.C., Montes, T., Palomo, J.M., Torres, R., López-Gallego, F., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. **2007a**. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization. *Biochem. Soc. Trans.*, 35(6), 1593-1601.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R. **2007b**. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.*, 40(6), 1451-1463.

- Mateo, C., Palomo, J.M., Fuentes, M., Betancor, L., Grazu, V., López-Gallego, F., Pessela, B.C.C., Hidalgo, A., Fernández-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. **2006**. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme Microb. Technol.*, 39(2), 274-280.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Van Langen, L.M., Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A. **2004**. A New, Mild Cross-Linking Methodology to Prepare Cross-Linked Enzyme Aggregates. *Biotechnol. Bioeng.*, 86(3), 273-276.
- Matijošyte, I., Arends, I.W.C.E., de Vries, S., Sheldon, R.A. **2010**. Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 62(2), 142-148.
- Miletić, N., Loos, K. **2009**. Over-Stabilization of Chemically Modified and Cross-Linked *Candida antarctica* Lipase B Using Various Epoxides and Diepoxides. *Aust. J. Chem.*, 62(8), 799-805.
- Miller, D.A., Prausnitz, J.M., Blanch, H.W. **1991**. Kinetics of lipase-catalysed interesterification of triglycerides in cyclohexane. *Enzyme Microb. Technol.*, 13(2), 98-103.
- Montes, T., Grazu, V., López-Gallego, F., Hermoso, J.A., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. **2006**. Chemical modification of protein surfaces to improve their reversible enzyme immobilization on ionic exchangers. *Biomacromolecules*, 7(11), 3052-3058.
- Montes, T., Grazú, V., Manso, I., Galán, B., López-Gallego, F., González, R., Hermoso, J.A., García, J.L., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. **2007**. Improved stabilization of genetically modified penicillin G acylase in the presence of organic cosolvents by co-immobilization of the enzyme with polyethyleneimine. *Adv. Synth. Catal.*, 349(3), 459-464.
- Moon, I.K., Kim, J., Lee, J., Jia, H., Hyon, B.N., Jong, K.Y., Ja, H.K., Dohnalkova, A., Grate, J.W., Wang, P., Hyeon, T., Hyun, G.P., Ho, N.C. **2007**. Crosslinked enzyme aggregates in hierarchically-ordered mesoporous silica: A simple and effective method for enzyme stabilization. *Biotechnol. Bioeng.*, 96(2), 210-218.
- Nakajima, N., Ikada, Y. **1995**. Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. *Bioconj. Chem.*, 6(1), 123-130.
- Nam, K., Kimura, T., Kishida, A. **2008**. Controlling coupling reaction of EDC and NHS for preparation of collagen gels using ethanol/water co-solvents. *Macromol. Biosci.*, 8(1), 32-37.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. **2008**. Proteínas: purificación y caracterización. in: *Lehninger Principios de bioquímica*, ARTMED, pp. 161-187.
- Ni, Y., Xu, J.H. **2012**. Biocatalytic ketone reduction: A green and efficient access to enantiopure alcohols. *Biotechnol. Adv.*, 30(6), 1279-1288.
- Oda, S., Inada, Y., Kobayashi, A., Ohta, H. **1998**. Production of Ethyl (R)-2-Hydroxy-4-phenylbutanoate via Reduction of Ethyl 2-Oxo-4-phenylbutanoate in an Interface Bioreactor. *Biosci. Biotech. Bioch.*, 62(9), 1762-1767.
- Okada, T., Morrissey, M.T. **2007**. Production of n - 3 polyunsaturated fatty acid concentrate from sardine oil by lipase-catalyzed hydrolysis. *Food Chem.*, 103(4), 1411-1419.
- Olde Damink, L.H.H., Dijkstra, P.J., Van Luyn, M.J.A., Van Wachem, P.B., Nieuwenhuis, P., Feijen, J. **1996**. Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. *Biomaterials*, 17(8), 765-773.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J.L., Verschueren, K.H.G., Goldman, A. **1992**. The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Protein Eng.*, 5(3), 197-211.
- Orrenius, C., Ohrner, N., Rottici, D., Mattson, A., Hult, K., Norin, T. **1995**. *Candida antarctica* lipase B catalysed kinetic resolutions: Substrate structure requirements for the preparation of enantiomerically enriched secondary alcohols. *Tetrahedron Asymmetry*, 6(5), 1217-1220.

- Osborn, H.T., Akoh, C.C. **2002**. Structured lipids-novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1(3), 110-120.
- Otten, L.G., Hollmann, F., Arends, I.W.C.E. **2010**. Enzyme engineering for enantioselectivity: from trial-and-error to rational design? *Trends Biotechnol.*, 28(1), 46-54.
- Ottolina, G., Bovara, R., Riva, S., Carrea, G. **1994**. Activity and selectivity of some hydrolases in enantiomeric solvents. *Biotechnol. Lett.*, 16(9), 923-928.
- Ottosson, J. **2001**. Enthalpy and Entropy in Enzyme Catalysis – A Study of Lipase Enantioselectivity. PhD Thesis. Royal Institute of Technology. Stockholm, Sweden, pp. 59.
- Ozturk, B. **2001**. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on hydrophobic and hydrophilic supports. M. Sci. Thesis. Izmir Institute of Technology. Izmir, Turkey, pp. 118.
- Palomo, J.M. **2003**. Control y modulación de la selectividad de derivados inmovilizados de distintas lipasas, en reacciones de química orgánica desarrolladas en sistemas macro-acuosos. PhD Thesis. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España, pp. 157.
- Palomo, J.M. **2009**. Modulation of enzymes selectivity via immobilization. *Current Organic Synthesis*, 6(1), 1-14.
- Palomo, J.M., Fernández-Lorente, G., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. **2007a**. Modulation of immobilized lipase enantioselectivity via chemical amination. *Adv. Synth. Catal.*, 349(7), 1119-1127.
- Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., Ortiz, C., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. **2002a**. Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: Hydrolytic resolution of mandelic acid esters. *Enzyme Microb. Technol.*, 31(6), 775-783.
- Palomo, J.M., Fuentes, M., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Guisan, J.M., Fernández-Lafuente, R. **2003**. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules*, 4(1), 1-6.
- Palomo, J.M., Muoz, G., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. **2002b**. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): Immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 19-20, 279-286.
- Palomo, J.M., Ortiz, C., Fernández-Lorente, G., Fuentes, M., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. **2005**. Lipase-lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. *Enzyme Microb. Technol.*, 36(4), 447-454.
- Palomo, J.M., Segura, R.L., Fernandez-Lorente, G., Fernandez-Lafuente, R., Guisán, J.M. **2007b**. Glutaraldehyde modification of lipases adsorbed on aminated supports: A simple way to improve their behaviour as enantioselective biocatalyst. *Enzyme Microb. Technol.*, 40(4), 704-707.
- Palomo, J.M., Segura, R.L., Mateo, C., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. **2004**. Improving the activity of lipases from thermophilic organisms at mesophilic temperatures for biotechnology applications. *Biomacromolecules*, 5(1), 249-254.
- Pan, J., Kong, X.D., Li, C.X., Ye, Q., Xu, J.H., Imanaka, T. **2011**. Crosslinking of enzyme coaggregate with polyethyleneimine: A simple and promising method for preparing stable biocatalyst of *Serratia marcescens* lipase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 68(3-4), 256-261.
- Park, J.W., Kajiuchi, T. **1995**. Development of effective modified cellulase for cellulose hydrolysis process. *Biotechnol. Bioeng.*, 45(4), 366-373.
- Pchelintsev, N.A., Youshko, M.I., Švedas, V.K. **2009**. Quantitative characteristic of the catalytic properties and microstructure of cross-linked enzyme aggregates of penicillin acylase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 56(4), 202-207.

- Perfetti, R.B., Anderson, C.D., Hall, P.L. **1976**. The chemical modification of papain with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide. *Biochemistry (Mosc)*, 15(8), 1735-1743.
- Persson, M., Costes, D., Wehtje, E., Adlercreutz, P. **2002**. Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity. *Enzyme Microb. Technol.*, 30(7), 916-923.
- Pessela, B.C.C., Torres, R., Batalla, P., Fuentes, M., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. **2006**. Simple purification of immunoglobulins from whey proteins concentrate. *Biotechnol. Prog.*, 22(2), 590-594.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E. **2004**. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, 25(13), 1605-1612.
- Pizarro, C., Brañes, M.C., Markovits, A., Fernández-Lorente, G., Guisán, J.M., Chamy, R., Wilson, L. **2012**. Influence of different immobilization techniques for *Candida cylindracea* lipase on its stability and fish oil hydrolysis. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 78, 111-118.
- Pleiss, J., Fischer, M., Schmid, R.D. **1998**. Anatomy of lipase binding sites: The scissile fatty acid binding site. *Chem. Phys. Lipids*, 93(1-2), 67-80.
- Prabhavathi Devi, B.L.A., Guo, Z., Xu, X. **2009**. Characterization of cross-linked lipase aggregates. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(7), 637-642.
- Pu, Y.J., Vaid, R.K., Boini, S.K., Towsley, R.W., Doecke, C.W., Mitchell, D. **2009**. A practical method for functionalized peptide or amide bond formation in aqueous ethanol media with edc as activator. *Org. Process Res. Dev.*, 13(2), 310-314.
- Qu, Z., Chen, K., Gu, H., Xu, H. **2014**. Covalent immobilization of proteins on 3D poly(acrylic acid) brushes: Mechanism study and a more effective and controllable process. *Bioconj. Chem.*, 25(2), 370-378.
- Quioco, F.A., Richards, F.M. **1966**. The enzymic behavior of carboxypeptidase-A in the solid state. *Biochemistry (Mosc)*. 5(12), 4062-4076.
- Quioco, F.A., Richards, F.M. **1964**. Intermolecular cross linking of a protein in the crystalline state *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*, 52, 833-839.
- Rade-Kukic, K., Schmitt, C., Rawel, H.M. **2011**. Formation of conjugates between  $\beta$ -lactoglobulin and allyl isothiocyanate: Effect on protein heat aggregation, foaming and emulsifying properties. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 694-706.
- Rakels, J.L.L., Straathof, A.J.J., Heijnen, J.J. **1993**. A simple method to determine the enantiomeric ratio in enantioselective biocatalysis. *Enzyme Microb. Technol.*, 15(12), 1051-1056.
- Rao, A.B., Rehman, H., Krishnakumari, B., Yadav, J.S. **1994**. Lipase catalysed kinetic resolution of racemic ( $\pm$ )-2,2-dimethyl-3-(2-methyl-1-propenyl)-cyclopropane carboxyl esters. *Tetrahedron Lett.*, 35(16), 2611-2614.
- Reetz, M.T. **2006**. Directed Evolution of Enantioselective Enzymes as Catalysts for Organic Synthesis. in: *Advances in Catalysis*, (Eds.) C.G. Bruce, K. Helmut, Vol. Volume 49, Academic Press, pp. 1-69.
- Rendón, X., López-Munguía, A., Castillo, E. **2001**. Solvent engineering applied to lipase-catalyzed glycerolysis of triolein. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(10), 1061-1066.
- Rinaudo, M. **2008**. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polym. Int.*, 57(3), 397-430.
- Rocha-Martin, J. **2012**. Reducciones asimétricas y oxidaciones selectivas catalizadas por deshidrogenasas inmovilizadas y estabilizadas. PhD Thesis. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España, pp. 274.

- Rodrigues, R.C., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R. **2011**. Coupling chemical modification and immobilization to improve the catalytic performance of enzymes. *Adv. Synth. Catal.*, 353(13), 2216-2238.
- Rodrigues, R.C., Bolivar, J.M., Volpato, G., Filice, M., Godoy, C., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. **2009**. Improved reactivation of immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus* by its coating with highly hydrophilic polymers. *J. Biotechnol.*, 144(2), 113-119.
- Rodrigues, R.C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Torres, R., Fernández-Lafuente, R. **2013**. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem. Soc. Rev.*, 42(15), 6290-6307.
- Roessl, U., Nahálka, J., Nidetzky, B. **2010**. Carrier-free immobilized enzymes for biocatalysis. *Biotechnol. Lett.*, 32(3), 341-350.
- Rogalska, E., Cudrey, C., Ferrato, F., Verger, R. **1993**. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. *Chirality*, 5(1), 24-30.
- Rotticci, D. **2000**. Understanding and Engineering the Enantioselectivity of *Candida antarctica* Lipase B towards sec-Alcohols. PhD Thesis. Royal Institute of Technology, pp. 61.
- Rotticci, D., Orrenius, C., Hult, K., Norin, T. **1997**. Enantiomerically enriched bifunctional sec-alcohols prepared by *Candida antarctica* lipase B catalysis. Evidence of non-steric interactions. *Tetrahedron Asymmetry*, 8(3), 359-362.
- Rousseau, D., Marangoni, A. **2008**. Chemical interesterification of food lipids: Theory and practice. Third ed. in: *Food Lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*, (Eds.) C. Akoh, D. Min, Taylor and Francis Group. CRC Press: United States of America, pp. 267-295.
- Rubio-Rodríguez, N., Beltrán, S., Jaime, I., de Diego, S.M., Sanz, M.T., Carballido, J.R. **2010**. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 11(1), 1-12.
- Rubio, E., Fernandez-Mayorales, A., Klivanov, A.M. **1991**. Effect of the solvent on enzyme regioselectivity. *J. Am. Chem. Soc.*, 113(2), 695-696.
- Rupley, J.A., Gratton, E., Careri, G. **1983**. Water and globular proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 8(1), 18-22.
- Şahin, N., Akoh, C.C., Karaali, A. **2006**. Human milk fat substitutes containing omega-3 fatty acids. *J. Agric. Food Chem.*, 54(10), 3717-3722.
- Sakai, T. **2004**. 'Low-temperature method' for a dramatic improvement in enantioselectivity in lipase-catalyzed reactions. *Tetrahedron Asymmetry*, 15(18), 2749-2756.
- Sakai, T., Kawabata, I., Kishimoto, T., Ema, T., Utaka, M. **1997**. Enhancement of the Enantioselectivity in Lipase-Catalyzed Kinetic Resolutions of 3-Phenyl-2H-azirine-2-methanol by Lowering the Temperature to -40°C. *J. Org. Chem.*, 62(15), 4906-4907.
- Salgin, S., Takaç, S. **2007**. Effects of additives on the activity and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase in a biphasic medium. *Chem. Eng. Technol.*, 30(12), 1739-1743.
- Sam, S., Touahir, L., Salvador Andresa, J., Allongue, P., Chazalviel, J.N., Gouget-Laemmel, A.C., De Villeneuve, C.H., Moraillon, A., Ozanam, F., Gabouze, N., Djebbar, S. **2010**. Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces. *Langmuir*, 26(2), 809-814.
- Sánchez, S. **2007**. Producción y purificación de las lipasas de *Candida antarctica*. Master Thesis. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
- Sarda, L., Desnuelle, P. **1958**. Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion. *Biochim. Biophys. Acta*, 30, 513-521.
- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B. **2001**. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409(6817), 258-268.

- Schoevaart, R., Wolbers, M.W., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, A.P.G., Van Rantwijk, F., Van Der Wielen, L.A.M., Sheldon, R.A. **2004**. Preparation, optimization, and structures, of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnol. Bioeng.*, 87(6), 754-762.
- Schrag, J.D., Li, Y., Cygler, M., Lang, D., Burgdorf, T., Hecht, H.J., Schmid, R., Schomburg, D., Rydel, T.J., Oliver, J.D., Strickland, L.C., Dunaway, C.M., Larson, S.B., Day, J., McPherson, A. **1997**. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure*, 5(2), 187-202.
- Shah, S., Sharma, A., Gupta, M.N. **2006**. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. *Anal. Biochem.*, 351(2), 207-213.
- Shalini S., D. **2012**. Global Markets for Chiral Technology. in: Business Communications Company Research. Wellesley, USA. <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/chiral-products-technology-global-markets-bio012f.html>.
- Sharma, S., Kanwar, S.S. **2014**. Organic solvent tolerant lipases and applications. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Sheldon, R.A. **2007a**. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®s): Stable and recyclable biocatalysts. *Biochem. Soc. Trans.*, 35(6), 1583-1587.
- Sheldon, R.A. **2011a**. Cross-linked enzyme aggregates as industrial biocatalysts. *Org. Process Res. Dev.*, 15(1), 213-223.
- Sheldon, R.A. **2011b**. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 92(3), 467-477.
- Sheldon, R.A. **2007b**. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv. Synth. Catal.*, 349(8-9), 1289-1307.
- Sheldon, R.A., Schoevaart, R., Van Langen, L.M. **2005**. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). *Biocatal. Biotransform.*, 23(3-4), 141-147.
- Sheldon, R.A., Van Pelt, S. **2013**. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chem. Soc. Rev.*, 42(15), 6223-6235.
- Sheldon, R.A., van Pelt, S., Kanbak-Aksu, S., Rasmussen, J.A., Janssen, M.H.A. **2013**. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) in organic synthesis. *Aldrichimica Acta*, 46(3), 81-93.
- Shimizu, M., Kawanami, H., Fujisawa, T. **1992**. A lipase-mediated asymmetric hydrolysis of 3-acyloxy-1-octynes and 3-(E)-acyloxy-1-octenes. *Chem. Lett.*, 107-110.
- Simopoulos, A.P. **2011**. Evolutionary aspects of Diet: The omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Mol. Neurobiol.*, 44(3), 203-215.
- Simopoulos, A.P. **1991**. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54(3), 438-463.
- Slusarewicz, P., Zhu, K., Hedman, T. **2010**. Kinetic characterization and comparison of various protein crosslinking reagents for matrix modification. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 21(4), 1175-1181.
- Smyth, C., Jonsson, P., Olsson, E., Soderlind, O., Rosengren, J., Hjertén, S., Wadström, T. **1978**. Differences in hydrophobic surface characteristics of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with or without K88 antigen as revealed by hydrophobic interaction chromatography. *Infect. Immun.*, 22, 462-472.
- Speranza, P., Macedo, G.A. **2012**. Lipase-mediated production of specific lipids with improved biological and physicochemical properties. *Process Biochem.*, 47(12), 1699-1706.
- St. Clair, N.L., Navia, M.A. **1992**. Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts. *J. Am. Chem. Soc.*, 114(18), 7314-7316.
- Stepankova, V., Bidmanova, S., Koudelakova, T., Prokop, Z., Chaloupkova, R., Damborsky, J. **2013**. Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents. *ACS Catal*, 3(12), 2823-2836.

- Takagi, Y., Ino, R., Kihara, H., Itoh, T., Tsukube, H. **1997**. Remarkable enhancement of lipase catalytic activity: Combined effects of acyl donor and thiacrown ether additive during trans-esterification of 5-phenyl-1-penten-3-ol. *Chem. Lett.*(12), 1247-1248.
- Takagi, Y., Teramoto, J., Kihara, H., Itoh, T., Tsukube, H. **1996**. Thiacrown ether as regulator of lipase-catalyzed trans-esterification in organic media: Practical optical resolution of allyl alcohols. *Tetrahedron Lett.*, 37(28), 4991-4992.
- Talekar, S., Joshi, A., Joshi, G., Kamat, P., Haripurkar, R., Kambale, S. **2013**. Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). *RSC Advances*, 3(31), 12485-12511.
- Tanaka, Y., Funada, T., Hirano, J., Hashizume, R. **1993**. Triglyceride specificity of *Candida cylindracea* lipase: Effect of docosahexaenoic acid on resistance of triglyceride to lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70(10), 1031-1034.
- Tang, K., Yi, J., Huang, K., Zhang, G. **2009**. Biphasic recognition chiral extraction: A novel method for separation of mandelic acid enantiomers. *Chirality*, 21(3), 390-395.
- Theil, F. **2000**. Enhancement of selectivity and reactivity of lipases by additives. *Tetrahedron*, 56(19), 2905-2919.
- Tischer, W., Kasche, V. **1999**. Immobilized enzymes: Crystals or carriers? *Trends Biotechnol.*, 17(8), 326-335.
- Torchilin, V.P., Maksimenko, A.V., Smirnov, V.N., Berezin, I.V., Klivanov, A.M., Martinek, K. **1978**. The principles of enzyme stabilization. III. The effect of the length of intra-molecular cross-linkages on thermostability of enzymes. *BBA - Enzymology*, 522(2), 277-283.
- Ueji, S.I., Ueda, A., Tanaka, H., Watanabe, K., Okamoto, T., Ebara, Y. **2003**. Chemical modification of lipases with various hydrophobic groups improves their enantioselectivity in hydrolytic reactions. *Biotechnol. Lett.*, 25(1), 83-87.
- Usha, R., Sreeram, K.J., Rajaram, A. **2012**. Stabilization of collagen with EDC/NHS in the presence of l-lysine: A comprehensive study. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 90(1), 83-90.
- Vaidya, B.K., Kuwar, S.S., Golegaonkar, S.B., Nene, S.N. **2012**. Preparation of cross-linked enzyme aggregates of l-aminoacylase via co-aggregation with polyethyleneimine. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 74(3-4), 184-191.
- Valdés, E.C., Soto, L.W., Arcaya, G.A. **2011**. Influence of the pH of glutaraldehyde and the use of dextran aldehyde on the preparation of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of lipase from *Burkholderia cepacia*. in: *Electron. J. Biotechnol.*, Vol. 14.
- Van Pouderooyen, G., Eggert, T., Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W. **2001**. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: A minimal  $\alpha/\beta$  hydrolase fold enzyme. *J. Mol. Biol.*, 309(1), 215-226.
- Velasco-Lozano, S., López-Gallego, F., Vázquez-Duhalt, R., Mateos-Díaz, J.C., Guisán, J.M., Favela-Torres, E. **2014**. Carrier-free immobilization of lipase from *Candida rugosa* with polyethyleneimines by carboxyl-activated cross-linking. *Biomacromolecules*, 15(5), 1896-1903.
- Velasco-Lozano, S., Rodríguez-González, J.A., Mateos-Díaz, J.C., Reyes-Duarte, D., Favela-Torres, E. **2012**. Catalytic profiles of lipolytic biocatalysts produced by filamentous fungi. *Biocatal. Biotransform.*, 30(5-6), 459-468.
- Verger, R. **1997**. 'Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts. *Trends Biotechnol.*, 15(1), 32-38.
- Vinogradov, A.A., Kudryashova, E.V., Grinberg, V.Y., Grinberg, N.V., Burova, T.V., Levashov, A.V. **2001**. The chemical modification of  $\alpha$ -chymotrypsin with both hydrophobic and hydrophilic compounds stabilizes the enzyme against denaturation in water-organic media. *Protein Eng.*, 14(9), 683-689.

- Volpato, G., Filice, M., Ayub, M.A.Z., Guisan, J.M., Palomo, J.M. **2010**. Single-step purification of different lipases from *Staphylococcus warneri*. *J. Chromatogr.*, 1217(4), 473-478.
- Wang, A., Zhang, F., Chen, F., Wang, M., Li, H., Zeng, Z., Xie, T., Chen, Z. **2011a**. A facile technique to prepare cross-linked enzyme aggregates using p-benzoquinone as cross-linking agent. *Korean J. Chem. Eng.*, 28(4), 1090-1095.
- Wang, C., Yan, Q., Liu, H.B., Zhou, X.H., Xiao, S.J. **2011b**. Different EDC/NHS activation mechanisms between PAA and PMAA brushes and the following amidation reactions. *Langmuir*, 27(19), 12058-12068.
- Wang, P.Y., Tsai, S.W., Chen, T.L. **2008**. Improvement of enantioselectivity and stability of *Klebsiella oxytoca* hydrolase immobilized on Eupergit C 250L. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 83(11), 1518-1525.
- Weissfloch, A.N.E., Kazlauskas, R.J. **1995**. Enantiopreference of lipase from *Pseudomonas cepacia* toward primary alcohols. *J. Org. Chem.*, 60(21), 6959-6969.
- Wernerova, M., Hudlicky, T. **2010**. On the practical limits of determining isolated product yields and ratios of stereoisomers: Reflections, analysis, and redemption. *Synlett*(18), 2701-2707.
- Whitesell, J.K., Reynolds, D. **1983**. Resolution of chiral alcohols with mandelic acid. *J. Org. Chem.*, 48(20), 3548-3551.
- Wilson, L. **2004**. Mejoras de las propiedades funcionales de enzimas industriales mediante la preparación de nuevos derivados de enzimas inmovilizadas sin soportes PhD Thesis. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España, pp. 143.
- Wilson, L., Fernández-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R., Illanes, A., Guisán, J.M., Palomo, J.M. **2006a**. CLEAs of lipases and poly-ionic polymers: A simple way of preparing stable biocatalysts with improved properties. *Enzyme Microb. Technol.*, 39(4), 750-755.
- Wilson, L., Illanes, A., Abián, O., Pessela, B.C.C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. **2004a**. Co-aggregation of penicillin G acylase and polyionic polymers: An easy methodology to prepare enzyme biocatalysts stable in organic media. *Biomacromolecules*, 5(3), 852-857.
- Wilson, L., Illanes, A., Pessela, B.C.C., Abian, O., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. **2004b**. Encapsulation of crosslinked penicillin G acylase aggregates in lentikats: Evaluation of a novel biocatalyst in organic media. *Biotechnol. Bioeng.*, 86(5), 558-562.
- Wilson, L., Illanes, A., Soler, L., Henríquez, M.J. **2009**. Effect of the degree of cross-linking on the properties of different CLEAs of penicillin acylase. *Process Biochem.*, 44(3), 322-326.
- Wilson, L., Palomo, J.M., Fernández-Lorente, G., Illanes, A., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. **2006b**. Effect of lipase-lipase interactions in the activity, stability and specificity of a lipase from *Alcaligenes* sp. *Enzyme Microb. Technol.*, 39(2), 259-264.
- Willis, W., Marangoni, A. **2008**. Enzymatic Interesterification. Third ed. in: *Food Lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*, (Eds.) C. Akoh, D. Min, Taylor and Francis Group. CRC Press: United States of America, pp. 807 – 839.
- Wine, Y., Cohen-Hadar, N., Freeman, A., Frolow, F. **2007**. Elucidation of the mechanism and end products of glutaraldehyde crosslinking reaction by X-ray structure analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 98(3), 711-718.
- Wu, J.Y., Liu, S.W. **2000**. Influence of alcohol concentration on lipase-catalyzed enantioselective esterification of racemic naproxen in isooctane: Under controlled water activity. *Enzyme Microb. Technol.*, 26(2-4), 124-130.
- Wu, X., Xiao, J. **2007**. Aqueous-phase asymmetric transfer hydrogenation of ketones - A greener approach to chiral alcohols. *Chem. Commun.*(24), 2449-2466.

- Xie, Y., An, J., Yang, G., Wu, G., Zhang, Y., Cui, L., Feng, Y. **2014**. Enhanced enzyme kinetic stability by increasing rigidity within the active site. *J. Biol. Chem.*, 289(11), 7994-8006.
- Xu, X. **2000**. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: A review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 102(4), 287-303.
- Xue, Y.P., Xu, S.Z., Liu, Z.Q., Zheng, Y.G., Shen, Y.C. **2011**. Enantioselective biocatalytic hydrolysis of (R,S)-mandelonitrile for production of (R)-(-)-mandelic acid by a newly isolated mutant strain. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 38(2), 337-345.
- Yang, H., Jönsson, Å., Wehtje, E., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. **1997**. The enantiomeric purity of alcohols formed by enzymatic reduction of ketones can be improved by optimisation of the temperature and by using a high co-substrate concentration. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1336(1), 51-58.
- Yang, T., Xu, X., He, C., Li, L. **2003**. Lipase-catalyzed modification of lard to produce human milk fat substitutes. *Food Chem.*, 80(4), 473-481.
- Yasufuku, Y., Ueji, S.I. **1997**. High temperature-induced high enantioselectivity of lipase for esterifications of 2-phenoxypropionic acids in organic solvent. *Bioorg. Chem.*, 25(2), 88-99.
- Yennawar, H.P., Yennawar, N.H., Farber, G.K. **1995**. A structural explanation for enzyme memory in nonaqueous solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, 117(2), 577-585.
- Yu, H.W., Chen, H., Wang, X., Yang, Y.Y., Ching, C.B. **2006**. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with controlled particles: Application to *Candida rugosa* lipase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 43(1-4), 124-127.
- Zhen, Q., Wang, M., Qi, W., Su, R., He, Z. **2013**. Preparation of  $\beta$ -mannanase CLEAs using macromolecular cross-linkers. *Catal. Sci. Technol.*, 3(8), 1937-1941.