



ESTABILIZACIÓN TÉRMICA DE LA LIPASA DE *Thermomyces lanuginosus* INMOVILIZADA EN FORMA DE AGREGADOS ENZIMÁTICOS ENTRECruzADOS (CLEAs)

Daniela Nava-Estrada, Susana Velasco-Lozano, Gerardo Saucedo-Castañeda, ¹Jesús Antonio Córdova-López, Ernesto Favela-Torres, Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Biotecnología, Av. San Rafael Atlixco N° 186, Col. Vicentina, México, DF. C.P. 09340, ¹Universidad de Guadalajara, biot_123@rocketmail.com

Palabras clave: CLEA, lipasa, estabilización térmica.

Introducción. Las lipasas son biocatalizadores finos aplicados en la síntesis de compuestos de valor industrial cuya síntesis requiere altos niveles de selectividad.¹ Sin embargo, estas enzimas presentan una baja estabilidad en condiciones a gran escala. La inmovilización de enzimas ha demostrado su eficacia para aumentar la robustez de éstos biocatalizadores.² Entre las técnicas de inmovilización, los agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) exhiben ventajas sobre otros, una preparación fácil, rápida y de bajo costo debido a la ausencia de soporte.³ No obstante, la preparación de CLEAs de lipasas entrecruzadas con glutaraldehído (GA) tiene rendimientos bajos ya que estas enzimas son pobres en lisina, las cuales están implicadas en el entrecruzamiento con GA. Recientemente, nuestro grupo de investigación desarrolló un protocolo para la preparación de carboxi-CLEAs en el cual la enzima es entrecruzada a través de sus grupos carboxilo (residuos de aspártico y glutámico).⁴ El objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones de preparación de los carboxi-CLEAs de la lipasa producida por *Thermomyces lanuginosus* (TLL-CLEAs) así como su termoestabilidad.

Métodos. El extracto enzimático de TLL fue obtenido en base al previamente descrito⁵ utilizando aserrín como soporte. Los TLL-CLEAs se prepararon en base a la metodología reportada⁴ utilizando 5 agentes precipitantes. Las mejores condiciones para la preparación de TLL-CLEAs fueron establecidas después de un diseño 3³. Las variables estudiadas fueron las concentraciones de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodimida (EDC), polietilenimina (PEI) y albúmina sérica bovina (BSA) en los niveles (+1) y (-1) (analizado por Statgraphics Centurion XVI Versión 16.0.07). Posteriormente, la desactivación térmica se realizó incubando los biocatalizadores a 55°C y pH 7 hasta encontrar menos del 50% de la actividad inicial.

Resultados. Para encontrar las mejores condiciones de preparación de TLL-CLEAs, se seleccionó al etanol como precipitante ya que con este solvente se recuperó la máxima actividad después de la precipitación (Tabla 1). El diseño experimental mostró que las concentraciones de BSA y EDC tienen un efecto significativo directamente proporcional a la actividad recuperada de TLL-CLEAs, mientras que la concentración de PEI no fue significativa (Fig.1A). Los tres factores mostraron un incremento en la actividad

recuperada en los niveles más altos (+1) (Fig.1B). Por lo tanto, las mejores condiciones para la preparación de TLL-CLEAs fueron 10 mM de EDC, 15 mg de BSA y 3.5 g/L PEI.

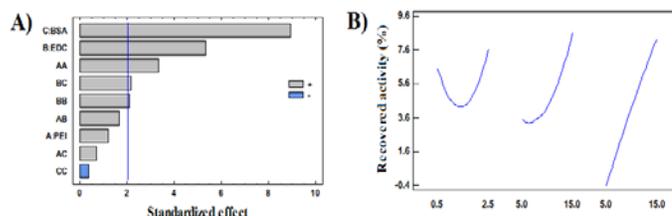


Fig. 1 A) Diagrama de Pareto de la actividad recuperada de CLEAs. B) Efectos principales sobre la actividad recuperada.

Posteriormente, la preparación de TLL-CLEAs con diferentes precipitantes mostró que la mayor actividad relativa recuperada en forma de CLEAs fue obtenida con el *tert*-butanol. Una vez obtenidas las TLL-CLEAs, se llevó a cabo la desactivación térmica. La enzima libre perdió toda su actividad después de 24 h a 55°C. En cambio, con excepción de los CLEAs precipitados con sulfato de amonio, los preparados con los otros 4 agentes precipitantes fueron estables a 55°C por más de 80 h (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto del precipitante sobre la enzima precipitada. CLEAs y su estabilidad térmica.

Precipitante	Actividad recuperada después de la precipitación (%)	Actividad relativa recuperada de CLEAs (%)	Vida media de CLEAs (h)
Etolanol	98.1	76.2	>80
Tert-butanol	95.7	100*	>80
Acetonitrilo	90.9	71.3	>80
PEG	97.6	85.3	>80
(NH ₄) ₂ SO ₄	84.1	34.8	35

Todas las CLEAs fueron preparadas con 10 mM de EDC, 15 mg de BSA y 3.5 g/L de PEI. * El 100% de la actividad relativa recuperada corresponde al 22% de la actividad inicial de la lipasa libre.

Conclusiones. Se obtuvieron TLL-CLEAs con una actividad recuperada máxima del 22%. Todos los CLEAs preparados tuvieron mayor termoestabilidad que la enzima libre a 55°C.

Agradecimientos. A Conacyt por la beca 2905110.

Referencias. 1. Jegannathan, K., et al. (2008). *Crit. Rev. Biotechnol.* (28) 253–264. 2. Adlercreutz, P. (2013). *Chem. Soc. Rev.* (42) 6406–6436. 3. Sheldon, R., et al. (2005). *Biocatal. Biotransform.* (23) 141–147. 4. Ávila, N., et al. (2014). *Appl Biochem Biotechnol.* (174)1859-1872. 5. Velasco, S., et al. (2014). *Biomacromolecules* (15)1896-1903.