



## INMOVILIZACIÓN DE LA LIPASA DE *Candida rugosa* CON SOPORTE Y SIN SOPORTE: MEJORA EN LA SELECTIVIDAD HACIA ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS.

Susana Velasco-Lozano, Fernando López-Gallego,<sup>1</sup> José M. Guisán,<sup>1</sup> Ernesto Favela-Torres, Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Biotecnología, Av. San Rafael Atlixco N° 186, Col. Vicentina, México, DF. C.P. 09340, <sup>1</sup>Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (ICP-CSIC) UAM, Madrid, España, susuvelo@gmail.com.

Palabras Clave: CLEA, inmovilización, selectividad, lipasas.

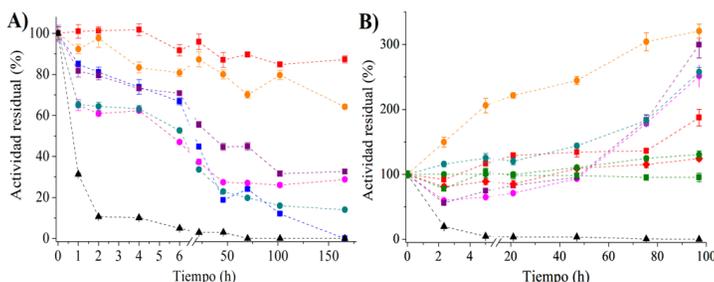
### Introducción.

Hoy en día, en laboratorio y a gran escala, la síntesis química cuenta con numerosos ejemplos de biocatálisis enzimática ya que las enzimas son catalizadores altamente específicos y selectivos que funcionan en condiciones de reacción suave y amigable con el medio ambiente.<sup>1</sup> Sin embargo, en muchas ocasiones no son suficientemente estables y activas en condiciones de operación industrial (pH, temperatura, solventes, concentración de sustratos y productos).<sup>2</sup> La inmovilización de enzimas ha sido una herramienta poderosa para la reutilización, estabilización y modulación de la selectividad enzimática. En este trabajo, la inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa* (CRL) sobre soportes (unión de la enzima a un soporte) y libre de soporte (entrecruzamiento en forma de agregados enzimáticos entrecruzados, CLEAs) fue llevada a cabo. Los biocatalizadores obtenidos fueron aplicados en la hidrólisis selectiva de ácidos grasos (AG) como el ácido eicosapentaenóico (EPA) y ácido docosahexaenóico (DHA), que son principales componentes del aceite de sardina y cuya purificación representa un reto para su producción industrial. Dichos AG son esenciales para el humano y se emplean en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.<sup>3</sup>

**Métodos.** La inmovilización de CRL en soportes<sup>4,5,6</sup> y sin soportes<sup>7</sup> fue realizada en base a metodologías reportadas. La termoestabilidad de los biocatalizadores preparados se determinó a 50°C y pH 7 en medio acuoso y en ciclohexano al 50%. La hidrólisis del aceite de sardina se llevó a cabo a 50°C en 50% ciclohexano/tampón fosfatos.<sup>8</sup>

**Resultados.** La CRL se inmovilizó por diferentes metodologías con las que se lograron diferentes orientaciones y conformaciones tridimensionales de la enzima. La CRL libre perdió el 80% de su actividad inicial en 2 h a 50°C en medio acuoso, así como en 50% ciclohexano (Fig 1). En todos los casos se obtuvieron biocatalizadores termoestables, siendo los de mayor termoestabilidad la glioxil-CRL y la naftil-CRL (Fig. 1A). Los CLEAs mantuvieron más del 60% de actividad residual después de 24 h a 50°C. En cuanto a la estabilidad en ciclohexano, todos los biocatalizadores mantuvieron más del 100% de actividad residual después de 100 h de incubación en presencia de solvente, incluso algunos como la naftil-CRL aumentaron su actividad (3

veces) en estas condiciones (Fig.1B, nótese el cambio de escala).



**Figura 1.** Estabilidad de la CRL libre e inmovilizada. **A)** Inactivación térmica. **B)** Estabilidad en ciclohexano. (■) Glioxil-CRL, (○) Naftil-CRL, (■) GA-CRL, (■) BrCN-CRL, (●) Octil-CRL, (●) MANAE-CRL, (■) Carboxi-CLEA, (●) Amino-CLEA y (▲) CRL libre.

Por otro lado, en la reacción de hidrólisis del aceite de sardina, la CRL libre mostró una baja selectividad EPA/DHA (4.3), mientras que se logró un notable aumento en la selectividad al emplear los CLEAs, en comparación con los derivados en soporte que resultaron menos selectivos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Selectividad de los derivados inmovilizados de la CRL en la hidrólisis del aceite de sardina.

Tipo de inmovilización	Biocatalizador 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 es expresada como la suma de EPA + DHA (μmol/min·g). <sup>2</sup>La selectividad se define como el cociente EPA/DHA.

### Conclusiones.

Los diferentes protocolos de inmovilización empleados permitieron obtener biocatalizadores CRL termoestables en medio acuoso y en 50% de ciclohexano. Solo los CLEAs aumentaron su selectividad EPA/DHA durante la hidrólisis del aceite de sardina.

### Referencias.

- Illanes A, et al., 2012, Bioresour Technol 115,48-57.
- Woodley JM, et al., Curr Opin Chem Biol, 2013, 17:310-316.
- Speranza P, et al., Process Biochem, 2012, 47:1699-1706.
- Mateo C, et al., Enzyme microb Technol, 2005, 37:456-462.
- Bastida A, et al., Biotechnol Bioeng, 1998, 58:486-493.
- Betancor L, et al., Enzyme Microb Technol, 2006, 39:877-882.
- Velasco S, et al., Biomacromolecules, 2014, 15:1896-1903.
- Fernández G, et al., J Am Oil Chem Soc, 2011, 88:1173-1178.