



ESTABILIZACIÓN DE LAS LIPASAS DE *CANDIDA ANTARCTICA*, *THERMOMYCES LANUGINOSUS* Y *RHIZOMUCOR MIEHIE* POR ADSORCIÓN EN HIDRÓXIDOS DOBLES LAMINARES

Jaime Mendoza Adriana, Carbajal Arizaga Gregorio Guadalupe, Córdova López Jesús Antonio, Mateo Díaz Juan Carlos, Universidad de Guadalajara (Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería), Guadalajara., Jal, Jama8507_@hotmail.com.

Palabras clave: estabilización, adsorción iónica, hidróxidos dobles laminares

Introducción.

Una lipasa puede ser definida como una triacilglicerol éster hidrolasas (EC. 3.1.1.3), cuya función biológica es catalizar la hidrólisis de ésteres, especialmente de cadena larga para producir ácidos grasos libres y glicerol en una interfase lípido-agua [2]. Además, las lipasas también son capaces de catalizar reacciones de síntesis en un medio no acuoso, mediante reacciones de esterificación, transesterificación, acidólisis, interesterificación, alcoholisis, aminólisis y oximólisis, en disolventes orgánicos anhidros de muchos ésteres naturales y sintéticos [8]. Sin embargo, las enzimas solubles no son adecuadas a escala industrial debido a la baja solubilidad, y a la dificultad de recuperación y de reúso [3]. No obstante, la inmovilización de enzimas sobre materiales inertes se ha empleado como estrategia para estabilización de un catalizador a nivel industrial.

Entre los soportes de inmovilización empleados se encuentran: los polímeros, los materiales inorgánicos, los materiales híbridos orgánicos-inorgánicos [4]. La modificación de estos últimos con compuestos orgánicos polares debe mejorar la interacción entre la enzima y el soporte, y la interacción debe ser principalmente por fuerzas físicas (puentes de hidrógeno, de Van del Waals, electrostáticas) o unión química [6].

Por lo tanto, comparando las enzimas solubles las propiedades catalíticas de las enzimas inmovilizadas en soportes con grupos hidrofóbicos como el dodecilsulfato de sodio (SDS), debe incrementar la actividad catalítica de la lipasa, por participar en el proceso de activación interfacial.

Los hidróxidos dobles laminares (HDL) son conocidos como arcillas sintéticas. Los compuestos están representados por la fórmula general: $[M^{2+}_{1-x}M^{3+}_x(OH)_2]^{x+} A^{m-}_{x/m} \cdot nH_2O$; donde M^{2+} y M^{3+} son los cationes involucrados y A, un anión de carga m^- [9]. Las características físico-químicas del espacio interlaminar dependen del anión, que puede ser orgánico y puede formar soportes nuevos para la inmovilización de especies catalíticas a través de la intercalación o mediante adsorción sobre la superficie externa. A pesar de las restricciones de tamaño con respecto a la intercalación de enzimas, pequeños aniones orgánicos intercalados permiten interactuar con las enzimas [4].

En este trabajo se sintetizó un HDL-Mg/Al (4:1), al cual fue preparado por la intercalación de moléculas de dodecilsulfato de sodio, y bajo el cual se probaron las condiciones de inmovilización de las lipasas antes citadas.

Otro mecanismo propuesto es la interacción de la enzima con grupos OH presentes en la superficie exterior de los cristales de los HDL. La inmovilización de una enzima en un soporte adecuado ha mostrado que incrementa la actividad y estabilidad de una enzima. Actualmente, se han empleado métodos físicos y químicos se en la inmovilización de lipasas de *C. antarctica* (CALB), *T. lanouiginosus* (TLL), *R. miehie* (RML). El método de adsorción de la enzima sobre un soporte es el más sencillo y barato en comparación con el método covalente [12].

Metodología

Síntesis de la hidrotalcita Mg/Al-NO₃⁻ con el método de [10, 11]. De donde D, es el soporte con la menor concentración de dodecilsulfato de sodio y A, es la máxima concentración en el soporte.

- Inmovilización de la lipasa [10]
 - Determinación de la concentración de proteína de acuerdo con el método de Bradford [5] y Lowry [7]
 - Caracterización físico-química del hidróxido doble laminar HDL antes y después de la inmovilización por XRD, FTIR, SEM y TEM.
- El análisis de difracción de rayos X (DRX) se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por [1]
 - La Espectroscopía de infrarrojo (FTIR) se realizó bajo las especificaciones establecidas en el artículo [1]
 - La microscopía electrónica de escaneo se realizó siguiendo el protocolo de [10]

Resultados

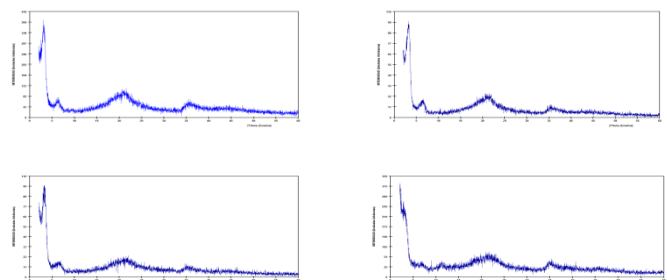


Fig. 1. Difractogramas de los soportes con SDS a) Mg/Al (4:1)A, b) Mg/Al (4:1)B, c) Mg/Al (4:1)C y d) Mg/Al (4:1)D.

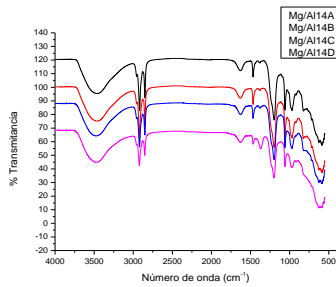


Fig. 2. Espectros de infrarrojo para los soportes con SDS.

a) Mg/Al (4:1)A, b) Mg/Al(4:1)B, c) Mg/Al (4:1)14C, d) Mg/Al(4:1)D.

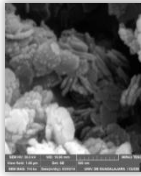
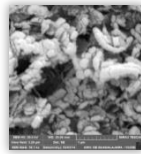


Fig. 3. Imágenes del microscopio electrónico del soporte Mg/Al (4:1) con una magnificación a) 58.1 kx, b) 114 kx.

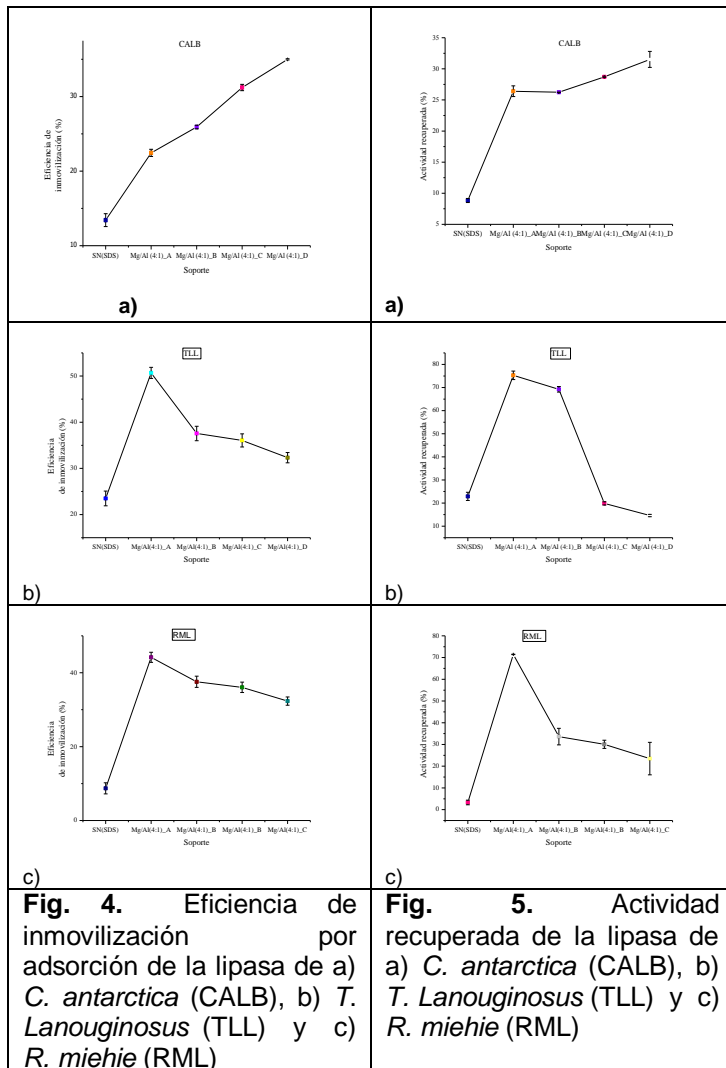


Fig. 4. Eficiencia de inmovilización por adsorción de la lipasa de a) *C. antarctica* (CALB), b) *T. Lanouginosus* (TLL) y c) *R. miehie* (RML)

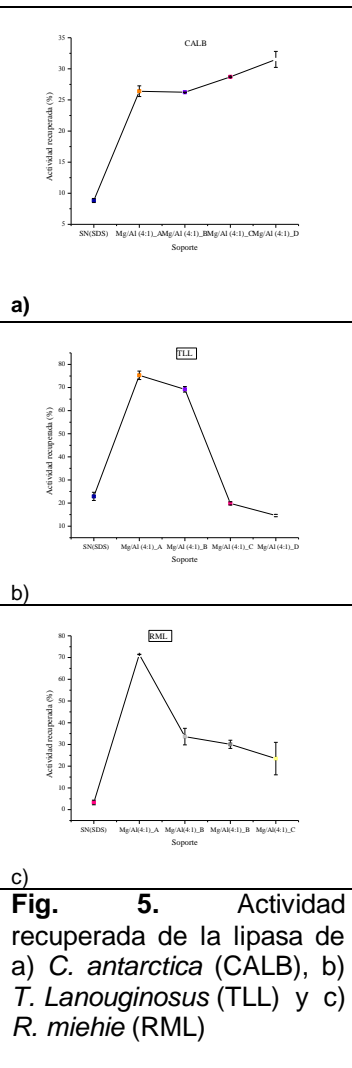


Fig. 5. Actividad recuperada de la lipasa de a) *C. antarctica* (CALB), b) *T. Lanouginosus* (TLL) y c) *R. miehie* (RML)

Conclusiones. En este trabajo fue posible inmovilizar las lipasas de *C. antarctica* (CALB), *T. lanouginosus* (TLL) y *R. miehie* (RML), obteniendo una mayor eficiencia de inmovilización con el soporte Mg/Al (4:1)D para la lipasa de *C. antarctica* (CALB) y con el soporte Mg/Al (4:1)A para las lipasas de *T. lanouginosus* (TLL) y *R. miehie* (RML). De las 3 lipasas inmovilizadas la que presentó mayor eficiencia de inmovilización fue la *T. lanouginosus* (TLL) con 52.08 % y con actividad recuperada de 54.48%. El pH óptimo de inmovilización fue de 7 en buffer de fosfatos para las 3 lipasas (datos no mostrados), así mismo, así como la temperatura de inmovilización fue de 25 °C en todos los casos.

Agradecimiento. Agradecimiento a CONACYT por la beca 333255 por la beca otorgada.

Bibliografía.

[1] Borges, R. M., Arizaga, G. G. C., & Wypych, F. (2009). Immobilization of enzymatic extract from *Penicillium camemberti* with lipoxygenase activity onto a hybrid layered double hydroxide. *Biochem. Eng. J.* 48: 93–98.

[2] Björkling F, Godtfredsen SE, Kirk O (1991). The future impact of industrial lipases. *Trends Biotechnol.* 9:360-363

[3] Chang, S.W., Shaw, J.F., Yang, K.H., Chang, S.F, Shen, C.J. (2008). *Bioresour. Technol.* 99: 2800-2805.

[4] Cheng, G.J., Yen, M.C., Wang, J.M., Lin, J.J, Chiu, H.C. (2008) *Biocunjug Chem.* 19:138-144.

[5] Kruger, N. J. (1994). The Bradford method for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology.* 32:9–15.

[6] Lei, C.H, Shin, Y., Liu, et al. (2002). *J. Am. Chem. Soc.* 124: 1142-1143

[7] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L., Randall, R. J., & Randall, R. J. (1951). ARTICLE: PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT.

[8] Noelker C, Bacher M, Gocke P, Gocke, Wei X, Klockgether T, Du Y, Dodel R (2005). The flavonoide caffeic acid phenethyl ester blocks 6-hydroxydopamine- induced neurotoxicity. *Neurosci Lett.* 383:39-43.

[9] Pereira, C.M.C, Herrero, M., Labajos, F.M., Marques, A.T., Rives, V. (2009). Preparation and properties of new flame retardant unsaturated polyester nanocomposites based on layered double hydroxides. *Polym Degrad Stab.* 94: 939–946.

[10] Rahman, M. B. A., Basri, M., Hussein, M. Z., Idris, M. N. H., Rahman, R. N. Z. R. A., & Salleh, A. B. (2004). Immobilisation of lipase from *Candida rugosa* on layered double hydroxides of Mg/Al and its nanocomposite as biocatalyst for the synthesis of ester. *Catal. Today.* 93-95: 405–410.

[11] Ren, L., He, J., Evans, D. G., Duan, X., & Ma, R. (2001). Some factors affecting the immobilization of penicillin G acylase on calcined layered double hydroxides. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic.* 16:65–71.

[12] Zhang, H., Zou, K., Sun, H., Duan, X. (2005). A magnetic organic-inorganic composite: Synthesis and characterization of magnetic 5-aminosalicylic acid intercalated layered double hydroxides. *J. Solid State Chem.* 178: 3485–3493.