



DETERMINACIÓN DE LA TOPO, REGIO Y ENANTIOSELECTIVIDAD DE LIPASAS OBTENIDAS DE UNA COLECCIÓN DE HONGOS TERMÓFILOS

KY. Ruiz, JC. Mateos, J. Nungaray, J. Córdova, J. Baratti*

Dep. de Ing. Química, CUCEI-Universidad de Guadalajara, Blvd. García Barragán y Calz. Olímpica. Col. Olímpica, 44430 Guadalajara, Jal. Fax: (33) 36194028. cordova@ccip.udg.mx.

*Groupe de Biocatalyse et Chimie Fine, Université de la Méditerranée, Marseille.

Palabras clave: Hongos termófilos, lipasas, especificidad

Introducción. El estudio de las enzimas de los hongos termófilos representa un gran interés para su aplicación en procesos de biocatálisis, debido a que estas enzimas han sido descritas como termoestables y resistentes a solventes orgánicos (1). Las lipasas (triacilglicerol ester hidrolasas EC 3.1.1.3) catalizan tanto la hidrólisis como la síntesis de un amplio rango de ésteres carboxílicos, con una alta regio- y/o enantioselectividad. Una de las etapas limitantes para la utilización de un catalizador enantioselectivo en síntesis química es su selección a partir de un gran número de muestras, ya que los productos de las reacciones se analizan generalmente por HPLC, GC o NMR, que en el mejor de los casos, cada determinación toma al menos 4h (2). En el presente trabajo, proponemos el empleo de un método espectrofotométrico, el cual permite llevar a cabo 96 reacciones simultáneamente, en 30 min, para agilizar el proceso de selección de lipasas enantioselectivas de entre una colección de hongos termófilos.

Metodología. Se cultivaron 40 cepas de hongos termófilos provenientes de la colección de la UdG. Los extractos enzimáticos brutos fueron preparados después de la incubación de estos hongos a 40°C durante 24h (3). Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo en microplaca, empleando ésteres de *p*-nitrofenol (pNP) como sustratos (2). La mezcla de reacción consistió en 5mM de sustrato, 10% acetonitrilo, 0.5mM pNP, 2.5mM BES (pH 7.2), 0.5% alcohol polivinílico. A 100µl de la solución anterior, le fueron agregados 20µl de solución enzimática. Esta mezcla fue incubada a 25°C y la liberación de pNP fue espectrofotométricamente monitoreada. La enantioselectividad se midió utilizando la solución anterior, pero añadiendo como sustratos (0.5mM) butirato de resorufina y R o S-glicidil butirato (4). La regio-selectividad se determinó analizando los productos de hidrólisis de la trioleína por cromatografía de capa fina. Controles fueron preparados para cada condición experimental y la hidrólisis espontánea fue sustraída a cada ensayo. Cada ensayo fue hecho por triplicado.

Resultados. De entre las 40 muestras de extractos enzimáticos, diez fueron seleccionadas por su alta actividad de hidrólisis de ésteres de pNP. Estos extractos brutos exhibieron una preferencia por la hidrólisis de ésteres, conteniendo ácidos grasos con cadenas de carbono de mediana a larga longitud (de seis carbonos en adelante), lo cual indica que estas enzimas tienen un comportamiento típico de lipasas y no de esterases (Fig. 1). Los diez extractos mostraron una regio-selectividad para las posiciones sn-1 y sn-3 de la trioleína. El Cuadro 1 muestra

el análisis de la enantio-selectividad de cuatro extractos enzimáticos. En esta tabla se observa que el extracto 23a hidrolizó preferentemente el R-; mientras que los extractos 8a, 9a y 42c hidrolizaron el S-glicidil butirato. Además, los coeficientes de enantioselectividad (EE) fueron más altos en el caso de los extractos 8a y 9a.

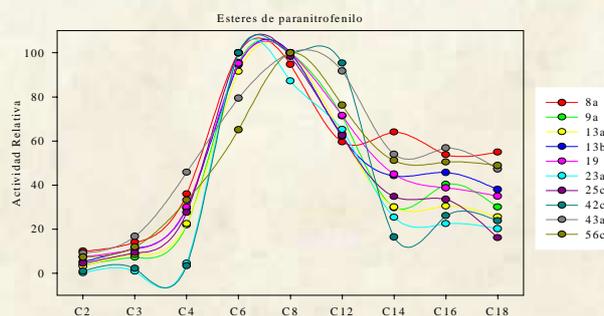


Fig1. Perfil de actividades enzimáticas para las diferentes lipasas con ésteres de *p*-nitrofenol.

Cuadro 1. Enantioselectividad para R- y S- glicidil butirato

Extracto	8a	9a	23a	42c
EE / e ⁺	3.3 / S	3.11 / S	1.23 / R	1.31 / S

e⁺ indica el enantiómero hidrolizado preferentemente.

Conclusiones. Mediante la implementación de un método espectrofotométrico que toma en cuenta la hidrólisis competitiva entre isómeros de ésteres (R o S- glicidil butirato) fue posible caracterizar muy rápidamente la enantioselectividad de lipasas provenientes de un gran número extractos enzimáticos. Estos resultados poseen una gran relevancia para su aplicación en la síntesis de productos enantiopuros para la industria farmacéutica y agroquímica, entre otras.

Bibliografía.

- Kazlauskas, R., Janes, L., Löwendahl, C., (1998). Quantitative screening of hydrolase libraries using pH indicators: Identifying active and enantioselective hydrolases. *Chem. Eur. J.* vol 11:2324-2331.
- Maheshwari R, Bharadwaj G, Bhat MK (2000) Thermophilic fungi: Their physiology and enzymes. *Microbiol mol biol rev* 64 (3): 461-488
- Mateos JC, Roussos S, Cordova J. Purification and characterization of a lipase produced in liquid or solid state fermentation by a thermophilic fungus, *Rhizopus homothallicus* Société Française de Microbiologie. Marseille, Francia 2-4 febrero 2005
- Kazlauskas, R., Man Fai Liu, A., Somers, N. (2001). Mapping de substrate selectivity of new hydrolases using colorimetric screening. *Tetrahedron:Asymmetry* vol 12:545-556.