



Inmovilización de lipasa de *Yarrowia lipolytica* en redes poliméricas interpenetradas de poli(acrilamida-polialcohol vinílico).

Ma. Elena Calixto Olalde¹, Antonio Martínez Richa¹, Arturo Flores Carreón². Facultad de Química¹ e Instituto de Investigaciones en Biología Experimental² de la Universidad de Guanajuato. Col. Noria Alta S/N. Fax 7320006-8111, richa@quijote.ugto.mx.

Palabras clave: *Inmovilización, IPNs, lipasa, Yarrowia lipolytica*

Introducción. En los últimos años el interés en la inmovilización de lipasas ha tenido un gran auge debido a que se incrementa la estabilidad de la enzima y con ello su uso repetitivo, disminuyendo de este modo los costos de operación y facilitando su rápida y fácil recuperación. Existe un gran número de soportes y métodos de inmovilización que han sido utilizados para inmovilizar lipasas recientemente. Después de la inmovilización se ha observado que se presentan cambios en la actividad, pH y temperatura óptimos, afinidad de los sustratos y estabilidad de la enzima.^[1-2] El grado de estos cambios va a depender del origen de la enzima, el tipo del soporte y el método de inmovilización.

Las redes interpenetradas (IPNs) son una combinación de uno o más polímeros en forma reticulada y se clasifican de acuerdo a su método de preparación. La IPNs de poli(acrilamida-polialcohol vinílico) (IPNs-PAAM/PVA) es un material que combina las propiedades hidrofílicas de la PAAM como la resistencia mecánica del PVA. La combinación de estos polímeros se espera de como resultado un soporte que permita incrementar la estabilidad y actividad hidrolítica de la lipasa de *Yarrowia lipolytica* (LYL).

Metodología. La preparación del soporte así como la obtención de la LYL se obtuvieron por modificación de métodos ya establecidos.^[3-4] La inmovilización de la LYL se realizó por adsorción en regulador de fosfatos a 4°C. La actividad se determinó por el método de fluorescencia utilizando como sustrato el palmitato de 4-metil umbeliferona. La proteína enlazada fue determinada de manera indirecta por el método de Bradford, por la diferencia entre la cantidad de proteína al inicio y al final del proceso de inmovilización.

Resultados y discusión. La inmovilización de la LYL en IPNs-PAAM/PVA permitió obtener un incremento en la actividad hidrolítica de la enzima. La cantidad de proteína inmovilizada hasta el momento en las IPNs-PAAM/PVA fue del 8% faltando por optimizar aún las condiciones de inmovilización, a pesar del bajo porcentaje en la inmovilización la actividad de la lipasa inmovilizada es 15 veces mayor que la lipasa libre.

El efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima fue determinado como se muestra en la Fig. 1. La actividad relativa representa que la actividad específica máxima es el 100%. Se encontró que el pH óptimo para la LYL fue de 7 y para el sistema inmovilizado de 8. El perfil de pH

para el sistema inmovilizado fue mucho más amplio comparado con el sistema libre.

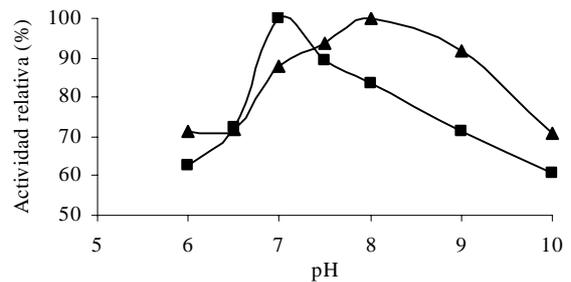


Fig. 1. Efecto de pH sobre la actividad enzimática. (■) lipasa libre, (▲) lipasa inmovilizada en IPNs-PAAM/PVA.

El desplazamiento de pH en el sistema inmovilizado se debe posiblemente al método de inmovilización, así como a las interacciones secundarias (por ejemplo, interacciones polares, iónicas o por puente de hidrógeno) entre la enzima y la matriz polimérica^[1] El sistema inmovilizado soporta cinco ciclos de uso terminando al final con una actividad hidrolítica del 20%. Se considera que una modificación en el método de inmovilización (enlace covalente) puede incrementar el número de ciclos de uso, estudios que serán realizados.

Conclusiones. La inmovilización de la LYL en el soporte de IPNs incrementa la actividad hidrolítica así como su estabilidad. Su actividad catalítica será probada en la polimerización de lactonas.

Bibliografía.

1. Kilic, A, Teke, M, Önal S, y Telefoncu A. (2006). Immobilization of Pancreatic Lipase on Chitin and Chitosan. *Prep. Bioch. & Biotech.* 36 : 153-163
2. Betancour, L, López F, Hidalgo, A, Alonso N, Dellamora G, Fernández, L, Guisán JM. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme and Microbial Technology.* (2006), 39:877-872
3. Calixto O. M. E., Romero G. J. *Tesis Doctoral.* Centro de Investigación en Química Aplicada, Saltillo Coahuila 2005.
4. Barrera K, Martínez R. Carreón A. (2006). Synthesis and characterization of poly(ϵ -caprolactone) obtained by enzymatic polymerization with *Yarrowia lipolytica* lipase. *Polym. Prep. (Am. Chem. Soc., Div Polym. Chem.)*.47(2):227-228.