



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



SÍNTESIS ENANTIOSELECTIVA CON LA ESTERASA StcI DE *Aspergillus nidulans*

María Elena Mondragón, Carolina Peña, Arturo Navarro, Ismael Bustos y Amelia Farrés
Universidad Nacional Autónoma de México, Fac. Química. Depto. Alimentos y Biotecnología. Ciudad Universitaria, 04510, D.F. México, farres@servidor.unam.mx

Palabras clave: esterasa, inmovilización, enantioselectividad.

Introducción. Las lipasas y esterases son de interés en síntesis orgánica debido a su estabilidad en solventes orgánicos y a la capacidad de reconocer centros quirales, presentando una elevada enantioselectividad. La inmovilización de enzimas permite su reuso, así como fácil recuperación de productos. El interés en la producción de compuestos ópticamente puros es debido a las características que presenta cada enantiómero, las cuales pueden llegar a ser muy diferentes.

El objetivo de este trabajo fue determinar la enantioselectividad de la esterasa StcI recombinante inmovilizada de *Aspergillus nidulans* en una reacción de síntesis de interés industrial, optimizar la reacción y compararla con una enzima comercial.

Metodología. La esterasa StcI recombinante se obtuvo por expresión en *P. pastoris* (1). Se inmovilizó en un soporte hidrófóbico (Accurel MP 1000). Para evaluar el rendimiento de la inmovilización, se cuantificó actividad enzimática (2), y proteína por el método de Bradford. Se determinó la presencia de la StcI en extracto crudo y sobrenadante después de la inmovilización (enzima no adherida) con zimogramas en geles (SDS-PAGE) y nativos. La estabilidad del biocatalizador se evaluó durante 24 h después de incubar en hexano, éter diisopropílico, *t*-butanol y acetona; a 25, 37 y 50°C. El 1-feniletanol se sintetizó químicamente y se corroboró por resonancia magnética nuclear (RMN). Para la síntesis, se disolvieron en 3 mL de hexano (secado con malla molecular 4Å a diferentes tiempos), 1-feniletanol y vinil acetato (ambos 200mM), después se adicionaron el biocatalizador (40mg de StcI ó 15 mg de Novozym 435) y la malla molecular (10%). La reacción se llevó a 37 °C, 200 rpm y se siguió la cinética durante 120 h. Las reacciones se evaluaron por cromatografía en capa fina (CCF) y con cromatografía de gases (CG) con columna quiral se determinó el exceso enantiomérico (ee), enantioselectividad (E) y conversión (C).

Resultados. Después de la inmovilización se adsorbió al soporte el 94.11% de la proteína inicial y se observa que el 35.31% de la proteína perdió actividad. Los geles revelan la presencia de StcI (35 kDa) de acuerdo a lo reportado (1), y el zimograma indica que es la única enzima con actividad de esterasa en el extracto crudo. El biocatalizador generado presenta mayor actividad a 37°C en hexano, por lo que la síntesis se realizó en estas condiciones. Los cromatogramas (Fig.1) muestran que

ambos biocatalizadores (generado y comercial) son selectivos para el isómero (R). Menor cantidad de agua en el solvente y mayor tiempo de reacción favorecen E. Las resoluciones con $E > 20$ son consideradas útiles para síntesis (3) por lo cual el valor E es bueno, para ambas enzimas, a las 120 h en un solvente secado por 168 h. Los resultados se encuentran resumidos en la tabla 1.

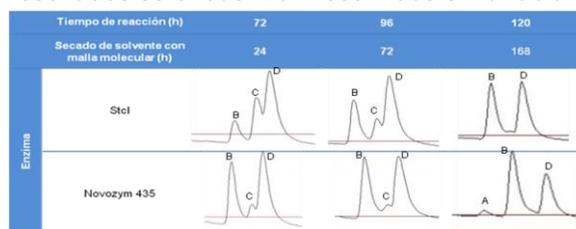


Fig. 1. Separación enantiomérica. A) S-1-Fenilacetato, B) R-1-Fenilacetato, C) R-1-Feniletanol, D) S-1-Feniletanol.

Tabla 1. Resolución del (R, S)-1-Feniletanol en hexano.

Tiempo de reacción (h)	StcI			Novozym 435		
	72	96	120	72	96	120
%ee _s	58.31	>99	>99	>99	>99	>99
%ee _p	17.66	44.21	76.84	40.67	61.38	87.48
E	2.33	11.86	38.88	10.70	20.44	78.00
%C _s	76.75	69.12	56.30	70.87	61.72	53.08
%C _p	23.24	30.87	43.69	29.12	38.27	46.91

Conclusiones. Se presentó una disminución de actividad después de la inmovilización. Se obtuvo una mayor actividad catalítica en un solvente no polar que en uno polar que permitió mostrar que la enzima StcI es enantioselectiva para la mezcla racémica evaluada. La enantioselectividad de la StcI y el grado de conversión dependen del tiempo y cantidad de agua en el medio de reacción.

Agradecimientos. PAPIIT IN2148092. Programa 127 de la Facultad de Química.

Bibliografía

- Peña-Montes C, Lange S, Castro-Ochoa D, Ruiz-Noria K, Cruz-García F, Schmid R, Navarro-Ocaña A, Farrés A. (2009). *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 61: 225-234.
- Ejima K, Liu J, Oshima Y, Hirooka K, Shimanuki S, Yokota Y, Hemmi H, Nakayama T, Nishino T. (2004). *J. Biosci. Bioeng.* 98(6): 445-451.
- Bornscheuer U.T, Kazlauskas R.J. (2006). Designing Enantioselective Reactions. En: *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations*. Bornscheuer U. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Alemania. 5-24.