

LIPASAS DE HONGOS INMOVILIZADAS. ESTUDIO DE SU SELECTIVIDAD FRENTE A UN ESTER RACÉMICO

Janny Coca, Odette Hernández, José L. Martínez

Grupo de Biotecnología, CIPRO, Fac. de Ingeniería Química, ISPJAE. Calle 127, s/n, Marianao, C.Habana, Cuba

Fax:537-272964, Email: janny@quimica.ispjae.edu.cu

Palabras claves: *Enantioselectividad, Hidrólisis, lipasas inmovilizadas*

Introducción. Las lipasas (E.C 3.1.1.3), son enzimas de gran especificidad, capaces de hidrolizar una sola especie en una mezcla racémica. Debido a esta propiedad que presentan y a la gran variedad de sustratos que aceptan, se han convertido en catalizadores de gran interés para obtener isómeros ópticamente puros, muy usados en la industria farmacéutica y agroquímica. (1)

Por la importancia del tema, así como el interés por estas enzimas para trabajos posteriores, se ha decidido en el presente trabajo estudiar la estereoespecificidad de diversas lipasas inmovilizadas en la reacción de hidrólisis de un ester bajo diferentes condiciones de reacción de pH y temperatura.

Metodología. Se emplearon cinco cepas de hongos, pertenecientes al cepario del Grupo de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería Química del ISPJAE. Las mismas fueron crecidas en un medio salino con sulfato de amonio al 1% y aceite de oliva al 2% como fuentes de nitrógeno y carbono respectivamente a 100 rpm y 30 °C, durante ocho días. Transcurrido esos días los diferentes cultivos filtrados y centrifugados fueron adsorbidos sobre gel octil agarosa y empleados para estudiar la reacción de hidrólisis selectiva del ester metil mandélico catalizada por los derivados enzimáticos de lipasas.

Los cultivos fueron seguidos por la determinación del peso seco a diversos intervalos de tiempo. La expresión de actividad lipolítica en los cultivos filtrados fue determinada espectrofotométricamente a 348nm.(2). El curso de las reacciones de hidrólisis fue seguido por HPLC a 254 nm, empleándose como fase móvil tampón fosfato 10mM con 20 % de Acetonitrilo pH 2.8.

Resultados y Discusión. Los resultados obtenidos arrojaron que todos los hongos eran productores de lipasas, alcanzándose niveles de actividad lipolítica entre 0.05-0.26 UI/mL.

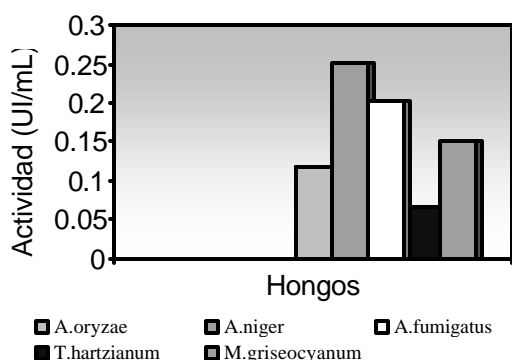


Figura 1 Actividad lipolítica máxima expresada por las cepas de hongos estudiadas

Se pudo comprobar que todos los microorganismos se desarrollaron de modo similar en el medio de cultivo empleado (los resultados de crecimiento no se reportan). Por otra parte se puede añadir que aunque la cepa J-1 de *A.niger* no sea la misma a la empleada por otros autores, la misma resultó la mejor productora de enzima lipasa, de igual modo la cepa de *A.fumigatus* mostró niveles altos de expresión y en la literatura no se encontró reporte alguno sobre lipasa producida por este microorganismo.

Los estudios de selectividad de la enzima arrojaron a resultados interesantes, algunos de ellos se presentan a continuación:

Derivado Octil	Condición experimental	E(S/R)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	pH 5 4°C	0.12
<i>Aspergillus fumigatus</i>	pH 4 4°C	16.7
<i>Aspergillus niger</i>	pH 7 4°C	0.56
<i>Aspergillus niger</i>	pH 5 4°C	0.50
<i>Aspergillus oryzae</i>	pH 7 25°C	0.17
<i>Aspergillus oryzae</i>	pH 7 4°C	0.5
<i>Mucor grysoceanum</i>	pH 7 4°C	0.4
<i>Mucor grysoceanum</i>	pH 4 4°C	20
<i>Trichoderma hartzianum</i>	pH 5 4°C	0.16
<i>Trichoderma hartzianum</i>	pH 4 4°C	2.78

Como se puede apreciar todos los derivados de las distintas lipasas fueron sensibles a las condiciones experimentales estudiadas en mayor o menor grado, por ejemplo la lipasa de *A.niger* inmovilizada incrementó su enantioselectividad hacia el isómero S de 0.12 a 16.7 cuando se disminuyó el pH del medio de reacción, al igual sucedió con la lipasa de *Mucor grysoceanum* aumentando la enantiopreferencia hacia el isómero S, mientras que para otros derivados las variaciones fueron pequeñas. De este modo una misma lipasa inmovilizada puede presentar enantioselectividades diferentes por simples cambios de las condiciones de reacción.

Conclusiones. La posibilidad de modular la enantioselectividad de una enzima ha sido ampliamente discutida en la literatura y diversas herramientas se han empleado para modificarla. Se comprobó que la variación de las condiciones del medio de reacción continúa siendo una de las más fáciles y económica, siempre y cuando puedan promoverse cambios en la enzima que causen modificación de la enantioselectividad de las mismas en diversas biotransformaciones.

Bibliografía.

- Schmid RD, Verger R. (1998). Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37:1608-1633.
- Guisán, JM. (1998). A single step purification, immobilisation, and hiperactivation of lipases via interfacial. *Biotechnol. Bioeng.* 58:486-493.