



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TRANSESTERIFICACIÓN ENANTIOSELECTIVA  
CATALIZADA POR LA ESTERASA StcI RECOMBINANTE  
E INMOVILIZADA DE *Aspergillus nidulans***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**MARÍA ELENA MONDRAGÓN TINTOR**



**MÉXICO, D.F.**

**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE.** Dr. Agustín López Munguía Canales

**VOCAL:** Dr. Raúl Genaro Aguilar Caballero

**SECRETARIO.** Dra. Amelia Farrés González Saravia

**1 er SUPLENTE:** Dr. Arturo Navarro Ocaña

**2° SUPLENTE:** Dra. Sandra Paola Sánchez Rodríguez

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E de la Facultad de Química. UNAM.

---

Dra. Amelia Farrés González Saravia

**Asesora del tema**

---

Dra. Carolina Peña Montes

**Supervisora técnica**

---

María Elena Mondragón Tintor

**Sustentante**

Este trabajo se presentó en el siguiente evento en la modalidad oral:

- “Síntesis enantioselectiva con la esterasa StcI de *Aspergillus nidulans*”, XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C., Junio 2011, Juriquilla, Querétaro.

Y en el siguiente evento en la modalidad de cartel:

- “Enantioselective synthesis of (R)-1-phenyl ethyl acetate by immobilized StcI recombinant esterase of *Aspergillus nidulans*”. Biotrans 2011, Sicilia, Italia.

## AGRADECIMIENTOS

Al financiamiento del proyecto PAPIIT IN231311 otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT).

Al Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación” de la Facultad de Química por el apoyo otorgado durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Arturo Navarro por sus asesorías en la parte de biocatálisis.

Al Dr. Ismael Bustos por recibirme en su laboratorio tan amablemente y tratarme como una integrante más de su equipo.

Al Dr. Miquel Gimeno por su gran cordialidad en la prestación de uno de sus equipos.

A los miembros del jurado por el tiempo que se tomaron para revisar la tesis y hacer las sugerencias para la mejora de esta.

Quiero agradecer a la Dra. Amelia Farrés por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por compartir su experiencia, por todos sus consejos brindados y por siempre ser tan comprensiva.

A la Dra. Carolina Peña quien fue una guía durante mi estancia en el laboratorio, por los muchísimos consejos que me dio, y porque además siempre recibí su apoyo junto con una sonrisa. Gracias Caro.

Agradezco infinitamente a mis papás porque siempre procuraron, dentro de sus posibilidades, proporcionarme todas las herramientas para salir adelante. Por todo el amor que me han provisto, por dar todo de sí cuando el destino estuvo en nuestra contra. Juntos sorteamos obstáculos y nos demostramos que somos mucho más grandes y valiosos que cualquier instante desagradable, y que de momentos difíciles se pueden aprender infinidad de cosas que no hacen más que engrandecernos. Sin duda alguna la culminación de este trabajo no hubiera sido posible sin ellos.

Me gustaría hacer extensivo el agradecimiento a Ale, a mi tía Mago, tío Nando, y toda mi demás familia. De manera especial a mis padrinos, Delia y Sergio, quienes siempre me han dado su cariño y me han hecho sentir de su hogar mi segunda casa.

A Lolita por ser hermosa desde la patita hasta el alma, y por ser quien me acompañó todas las madrugadas de mi vida mientras le fue posible.

A Jocelin no sólo por ser mi compañera de clases desde el primer semestre, sino además por ser una increíble amiga con quien he compartido los momentos más significativos de mi vida.

A Alejandro por ser más que un amigo, un hermano.

Quiero dar las gracias a mis demás amigos de la facultad; Thalía, Alberto (Topy), Gris, Ara, Ulises, Paris, Lalo, Leo y Erick, por colmar mi estancia en la facultad de momentos agradables y por estar conmigo en las buenas y en las malas.

Deseo expresar mi agradecimiento a Monse, a quien conozco desde la prepa, por la bonita amistad que me ha dado a lo largo de todos estos años.

Agradezco a mis compañeros del laboratorio 312; Laura, Katia, Israel, Mirna, Serch, Lalo, Myrna, Xim, Aline y Ales, por su ayuda y amistad que me ofrecieron durante mi paso en el laboratorio. Especialmente quiero darle mi agradecimiento a Eva, ya que fue quien desde mi llegada me dio su compañía la cual rápidamente se convirtió en una gran amistad, muchas gracias por todos los agradables momentos que hemos pasado juntas dentro, y más aun fuera del laboratorio.

A la Facultad de Química que me proporcionó las armas para una formación científica.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, que me brindó una formación integral promoviendo el conocimiento en sus diversas áreas, es un honor pertenecer a esta institución.

*Si buscamos una sociedad que comprenda mejor la importancia de la ciencia y la tecnología, que conozca los beneficios y los riesgos que acompañan a su desarrollo y que sepa de los alcances que pueden tener en la solución de problemas sociales; la labor del científico debe ir más allá del mero trabajo en el laboratorio, parte de su compromiso es la comunicación de la ciencia a todos los sectores sociales y no sólo entre las comunidades científicas, de tal modo que se promueva la participación social con un pensamiento reflexivo y crítico, que permita tomar decisiones adecuadas para lograr soluciones que nos involucren a todos. Debemos apostar por una sociedad con cultura científica y humanística.*

*Además, es primordial que como científicos consideremos el impacto social y ambiental de nuestra labor. El desarrollo de la ciencia tiene que respetar en todo momento a la naturaleza y a los pueblos que la habitan.*

*A mis padres,  
con todo mi amor.*



# ÍNDICE

<b>1. Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Introducción</b> .....	<b>3</b>
2.1 Lipasas y esterasas.....	4
A. Estructura y mecanismo.....	4
B. Fuentes de esterasas.....	7
C. Aplicaciones de las esterasas.....	7
D. Fuentes de lipasas.....	9
E. Aplicaciones de las lipasas.....	10
F. Importancia de los compuestos enantioméricos.....	11
G. Características del producto de interés.....	13
H. Lipasa B de <i>Candida antarctica</i> .....	14
I. Carboxilesterasas en <i>Aspergillus nidulans</i> .....	15
J. Inmovilización de enzimas.....	16
1. Ventajas y desventajas.....	18
2.2 Enzimas como biocatalizadores en medios orgánicos.....	19
A. Conformación de la proteína.....	20
B. Inhibición competitiva.....	20
C. Efecto del contenido de agua.....	21
2.3 Resoluciones cinéticas.....	22
A. Enantioselectividad.....	24
B. Resolución cinética de alcoholes secundarios.....	26
C. Métodos analíticos para evaluar resoluciones cinéticas.....	27
<b>3. Antecedentes</b> .....	<b>29</b>
A. Modelo estructural de la esterasa StcI.....	29
B. Caracterización de la enzima libre.....	29
C. Reacciones de desacetilación.....	30
D. Inmovilización de la enzima y su caracterización.....	32
<b>4. Justificación</b> .....	<b>33</b>
<b>5. Hipótesis</b> .....	<b>34</b>
<b>6. Objetivos</b> .....	<b>35</b>

A. General.....	35
B. Específicos.....	35
<b>7. Reactivos .....</b>	<b>36</b>
<b>8. Materiales y métodos.....</b>	<b>38</b>
A. Reactivación del microorganismo.....	38
B. Generación de biomasa.....	39
C. Expresión de la enzima.....	39
D. Verificación de actividad de esterasa.....	40
E. Concentración del extracto enzimático.....	41
F. Caracterización del extracto enzimático.....	41
1. Cuantificación de actividad de esterasa.....	41
2. Cuantificación de proteína.....	42
3. Perfil de proteínas.....	42
3.1 Tratamiento de la muestra.....	42
3.2 Tinción con plata.....	42
4. Zimograma.....	43
G. Inmovilización.....	43
1. Pretratamiento del soporte.....	43
2. Proceso de adsorción.....	43
H. Caracterización de la proteína no adherida.....	44
I. Evaluación de la actividad de la enzima con diferentes solventes.....	44
J. Reacción de biocatálisis.....	45
1. Síntesis química del sustrato.....	45
2. Caracterización del sustrato.....	45
2.1 Cromatografía en capa fina (CCF).....	45
2.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	45
2.3 Cromatografía de gases (CG).....	46
3. Síntesis química del estándar del acetato.....	46
4. Síntesis enzimática.....	47
4.1 Deshidratación del solvente.....	47
4.2 Resolución del (R,S)-1-Feniletanol.....	47

---

5. Evaluación de las reacciones.....	48
5.1 CCF.....	48
5.2 CG.....	48
<b>9. Resultados y discusión.....</b>	<b>49</b>
A. Expresión de la enzima.....	49
B. Verificación por gel SDS-PAGE y zimograma.....	50
C. Inmovilización.....	51
D. Determinación de actividad con distintos solventes.....	55
E. Reacción de biocatálisis.....	57
1. Síntesis química del sustrato.....	57
2. Caracterización del sustrato.....	57
2.1 CCF.....	58
2.2 RMN.....	59
2.3 CG.....	59
3. Control del $a_w$ del solvente previo a la reacción.....	60
4. Resolución cinética.....	61
5. Separación enantiomérica con columna quiral.....	63
6. Efecto del solvente.....	69
<b>10. Conclusiones.....</b>	<b>73</b>
<b>11. Bibliografía.....</b>	<b>75</b>

## 1. RESUMEN

El uso de enzimas como biocatalizadores en sistemas orgánicos ha crecido en los últimos años debido a las ventajas que ofrece sobre medios acuosos. En este contexto las lipasas y esterases resultan de gran interés debido a la estabilidad que exhiben, a la enantioselectividad que presentan y a su capacidad de síntesis. El objetivo del presente trabajo fue determinar la enantioselectividad de la esterasa StcI recombinante e inmovilizada, proveniente de *Aspergillus nidulans* en una reacción de síntesis de interés industrial, optimizar la reacción y compararla con la enzima más ampliamente utilizada en la industria (lipasa B de *Candida antarctica*).

Se obtuvo a la esterasa StcI por expresión en *Pichia pastoris*, se recuperó y se inmovilizó por el método de adsorción a un soporte de polipropileno (Accurel MP 1000). El biocatalizador generado se caracterizó en presencia de distintos solventes (hexano, éter diisopropílico, *tert*-butanol y acetona) y diferentes temperaturas. Los resultados indicaron que la enzima inmovilizada retuvo la mayor actividad en hexano a 37°C.

Se evaluó la enantioselectividad de la enzima por medio de una reacción de transesterificación, empleando como sustrato la mezcla racémica del 1-feniletanol previamente sintetizado y, como donador de acilo, vinil acetato. La reacción se llevó con hexano y fue monitoreada por cromatografía de gases con columna quiral. Se logró optimizar la reacción obteniéndose un valor E de 31.31 a las 120 horas de reacción en hexano con un  $a_w$  inicial de 0.066. Si se considera que reacciones enzimáticas con  $E > 20$  son útiles para las resoluciones racémicas (Bornscheuer, 2006). Se puede concluir que la esterasa StcI de *Aspergillus nidulans* es un biocatalizador aceptable en la síntesis del (R)-1-Fenilacetato, el cual puede tener aplicaciones importantes en el área de los alimentos.

Para conocer el efecto del solvente la reacción se llevó a cabo en éter diisopropílico. Lo que se observa es que dicho solvente afecta de manera negativa la actividad catalítica de ambas enzimas.

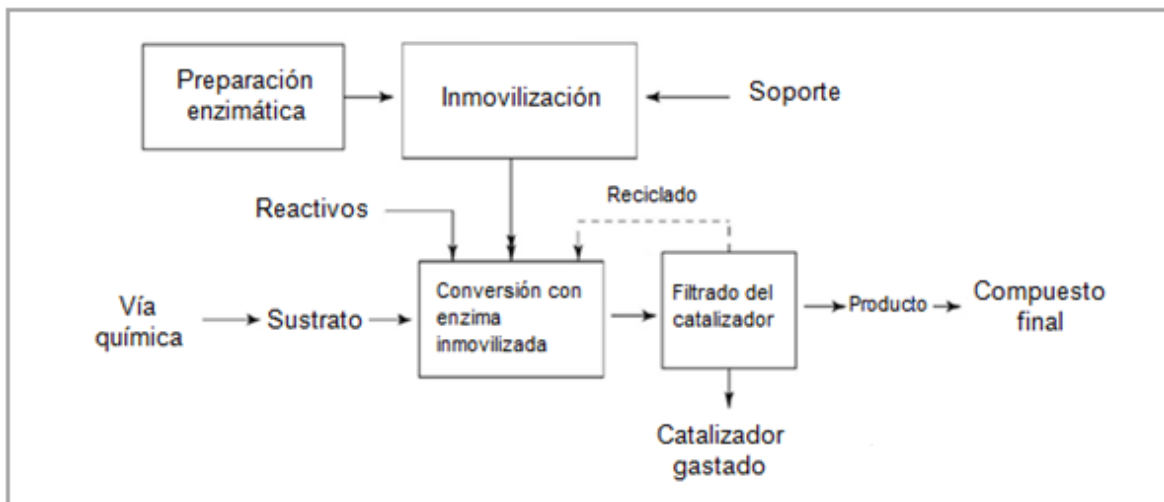
A las condiciones de estudio, Novozym 435 muestra mayor enantioselectividad y grado de conversión que la esterasa StcI, lo cual indica que a pesar de la similitud en el plegamiento y de que ambas enzimas cuenten con los mismos residuos de aminoácidos en el sitio activo, pueden existir ciertas variaciones entre la estructura de cada enzima, lo que resulta en diferentes efectos sobre las propiedades catalíticas. Por otro lado la pureza de la enzima comercial es mayor que la de la StcI, lo cual también puede influir en los resultados.

## 2. INTRODUCCIÓN

La biotecnología es una alternativa viable a la tecnología química de procesos convencionales. Esto es debido a que los sistemas biológicos presentan como ventaja llevar a cabo conversiones químicas complejas bajo condiciones suaves de reacción con un alta especificidad y eficiencia a diferencia de la catálisis química. La variedad de transformaciones químicas catalizadas por enzimas ha hecho de estos catalizadores los principales objetivos de explotación por las industrias biotecnológicas. La tecnología enzimática (un campo de la biotecnología) involucra el desarrollo de procesos para la producción de bienes, como son alimentos, aminoácidos, vitaminas y químicos finos (fármacos) (Bornscheuer et al, 2005).

Las enzimas son necesarias para los sistemas vivos, ya que se encargan de catalizar todas las reacciones químicas requeridas para su supervivencia y reproducción de una manera rápida, selectiva y eficiente. Estas propiedades de las enzimas son aprovechadas en la tecnología enzimática para la catálisis de reacciones químicas a escala industrial. En particular, han sido explotadas en la resolución de mezclas racémicas, debido a la creciente demanda de compuestos enantiopuros. Desde ese punto de vista la enantioselectividad resulta una valiosa característica de estos biocatalizadores. La tecnología enzimática en medios no acuosos es especialmente atractiva en este aspecto, ya que las enzimas en solventes orgánicos son capaces de catalizar procesos asimétricos que son termodinámicamente desfavorecidos en agua. Además, algunas veces el agua origina reacciones secundarias indeseadas y la recuperación de los productos puede llegar a ser difícil en este medio (Klibanov, 2001).

Las reacciones enzimáticas se pueden llevar a cabo en procesos por lote o continuos (Figura 1). Usualmente, las enzimas son usadas en forma inmovilizada, lo que genera una mejora en la estabilidad del biocatalizador y posibilita su uso en un modo continuo o al menos en varios procesos por lote. Todo lo anterior ha traído una expansión en las transformaciones catalizadas por enzimas, siendo utilizadas ampliamente en un gran número de procesos industriales (Schrader et al, 2004).

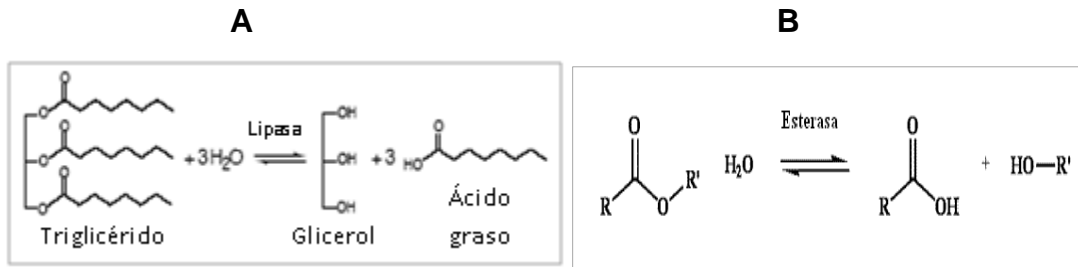


**Figura 1.** Diagrama de flujo de un proceso biocatalítico por lote o en modo continuo (Pollard et al, 2006).

## 2.1 Lipasas y esterasas

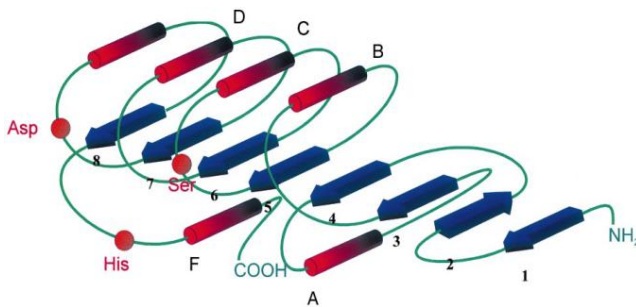
### A. Estructura y mecanismo

Las lipasas (EC 3.1.1.3) y esterasas (EC 3.1.1.1) son enzimas que se encargan de catalizar la hidrólisis de enlaces éster. Las lipasas actúan preferentemente sobre ésteres insolubles en agua como los triglicéridos y las esterasas actúan sobre ésteres solubles en agua, como ésteres de cadena corta (Figura 2) (Bornscheuer et al, 2006).



**Figura 2. (A)** Reacción catalizada por lipasas. **(B)** Reacción catalizada por esterasas.

Las lipasas y esterasas presentan un plegamiento  $\alpha/\beta$ , el cual consta de un núcleo de ocho hojas  $\beta$  dispuestas paralelamente y rodeadas por  $\alpha$ -hélices (Figura 3). La triada catalítica está compuesta por residuos, unidos por puentes de hidrógeno de histidina, ácido glutámico o aspártico, y por un residuo nucleofílico de serina, así como de un hueco oxianión (Bornscheuer et al, 2006; Arroyo, 2000).

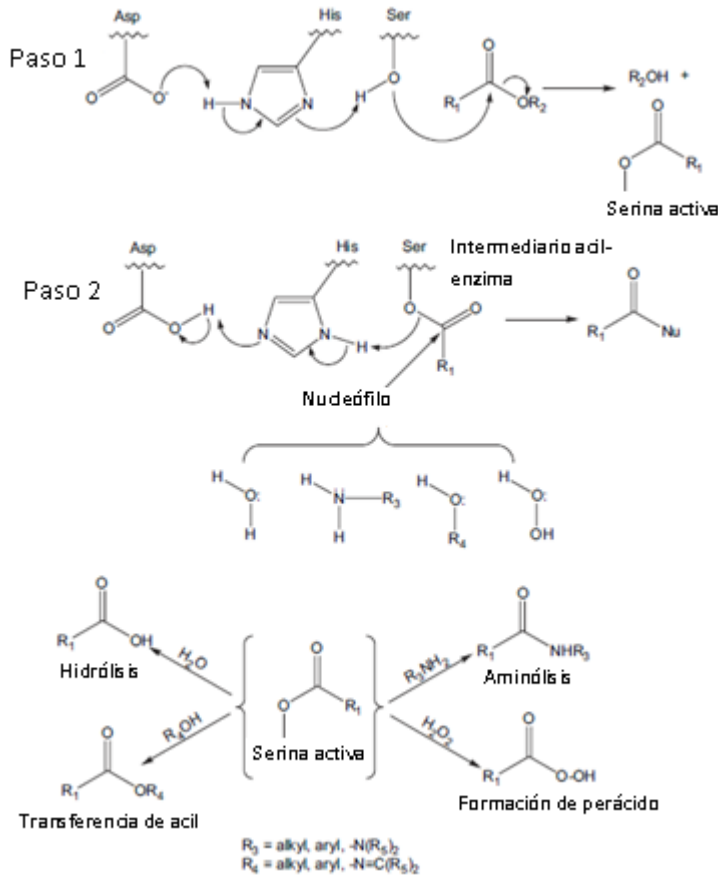


**Figura 3.** Plegamiento  $\alpha/\beta$ . Hojas  $\beta$  (1-8) mostradas con las flechas azules, los cilindros rojos indican las  $\alpha$ -hélices. Los círculos anaranjados muestran la posición de los aminoácidos de la triada catalítica.

El mecanismo catalítico de las lipasas y esterasas involucra un intermedio acil-enzima y dos diferentes intermediarios tetraédricos. Primero el carbono carbonílico del enlace éster del sustrato se une al grupo a la serina activada formando el primer intermedio tetraédrico. Dicho intermediario se rompe y el alcohol se libera, lo que lleva a la formación del complejo acil-enzima. Se produce un segundo ataque nucleofílico, que en una reacción de hidrólisis es una molécula de agua, la que ataca al carbono carbonílico del complejo acil-enzima formándose un segundo intermedio tetraédrico, el cual se rompe liberando el ácido y regenerando el  $-\text{OH}$  de la serina. La función del ácido glutámico o aspártico presente en la triada catalítica es la estabilización de la carga positiva generada sobre la histidina en los intermedios tetraédricos. Alternativamente, si el medio está constituido por un

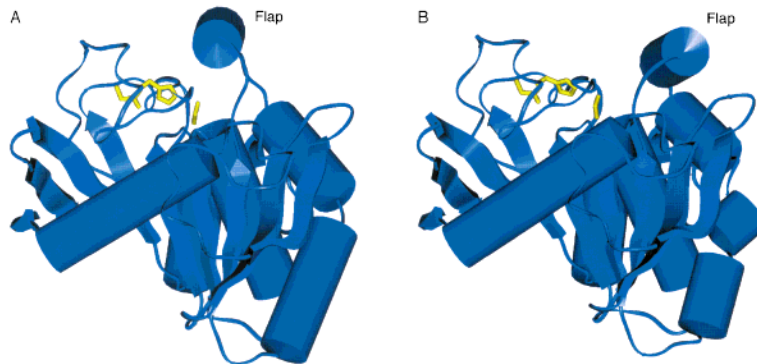


solvente orgánico, un nucleófilo diferente al agua, por ejemplo un alcohol, puede atacar al complejo acil-enzima y de este modo producir un nuevo éster (Figura 4) (Bornscheuer et al, 2006; Arroyo, 2000).



**Figura 4.** Mecanismo catalítico de las serin hidrolasas (Ghanem, 2007).

La estructura tridimensional de las lipasas sugiere una activación interfacial, fenómeno debido a la presencia de una secuencia peptídica anfifílica en forma de  $\alpha$  hélice que cubre, como una tapa, al sitio activo de la enzima en solución. Cuando ocurre la interacción de la enzima con la interfase lípido/agua, dicha tapa sufre un rearrreglo conformacional, lo que trae como consecuencia que el sitio activo se haga accesible al sustrato (Figura 5). Sin embargo existe evidencia de que no todas las lipasas presentan el fenómeno de activación interfacial. Por ejemplo, las de *Pseudomonas glumae* y de *Candida antarctica* (tipo B), poseen una tapa anfifílica que cubre al sitio activo, pero no muestran dicha activación (Schmid et al, 1998).



**Figura 5.** Estructura de la lipasa de *Mucor miehei*. (A) Muestra la conformación cerrada y (B) la conformación abierta. La triada catalítica en amarillo (Schmid et al, 1998).

### B. Fuentes de esterasas

Se han logrado extraer esterasas de diversos microorganismos como *Streptomyces* sp, *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp, *Lactobacillus* sp, *Thermoanaerobacterium* sp, *Micrococcus* sp, *Pencillium* sp, *Aspergillus* sp, *Humicola* sp, *Sporotrichum* sp, *Saccharomyces* sp, *Candida* sp, de fuentes animales y de plantas, y las cuales presentan aplicaciones importantes en diversos procesos biológicos. Estas enzimas son producidas por diferentes vías, y por lo cual se requieren de distintas estrategias de purificación para cada una.

### C. Aplicaciones de esterasas

Las esterasas desempeñan un papel muy importante en diversas industrias. Los ácidos ferúlico, sinápico, caféico y cumárico son ampliamente usados en las industrias de alimentos, bebidas y perfumes. Sus ésteres están presentes en cereales y residuos agro-industriales. Esterasas de *Aspergillus niger*, junto con pectinasas, celulasas y xilanasas, son capaces de producir ácidos hidroxicinámicos a partir de salvado de trigo, de arroz, caña de azúcar, bambús, etc.

Por otro lado las esterasas han sido usadas en productos lácteos, producción de vinos, jugos de frutas, cerveza y alcohol. Por ejemplo, son usadas en reacciones de transesterificación con el fin de mejorar la calidad de grasas y aceites. También han sido utilizadas para hidrolizar la grasa de la leche con el propósito de incrementar el sabor del queso. El aroma a fresa ha sido desarrollado con esterasas y lipasas de *Pseudomonas fragi*.

Algunos contaminantes sintéticos como plásticos, poliuretano, poliéster, entre otros, son degradados por esterasas. Para degradar el poliéster se han utilizado esterasas provenientes de *Pseudomonas chlororophis* y de *Pseudomonas aeruginosa*.

Dentro de la industria farmacéutica las esterasas son de gran importancia en la síntesis de fármacos quirales. Por ejemplo una esterasa de *Trichosporon brassicae* ha sido empleada para la producción del (S) y/o (R)- ketoprofeno ópticamente puros, los cuales son muy efectivos en la disminución de la inflamación y del dolor causado por la artritis, las quemaduras solares y la menstruación. Otros microorganismos como *Rhodococcus* sp, *Bacillus circulans*, *Pseudomonas* sp y *Bacillus coagulans* son capaces de producir compuestos quirales de importancia para esta industria.

En el área de la agricultura los compuestos organofosforados son utilizados como insecticidas, sin embargo sus residuos son tóxicos para el medio ambiente y pueden contaminar productos alimenticios. En este contexto las fosfotriesterasas de *Brevundimonas diminuta* y *Alteromonas* sp son usadas como descontaminantes degradando estas sustancias organosofosforadas.

Las esterasas también son muy usadas en otras industrias como la del papel, la textil y la del cuero. Esterasas de *Pseudomonas* sp, *Chromobacterium viscosum* y *Candida rugosa* son comúnmente aprovechadas durante la manufactura del papel (Panda y Gowrishankar, 2005).

### D. Fuentes de lipasas

Las lipasas se encuentran en la mayoría de los microorganismos, plantas y animales y se pueden obtener por el cultivo de microorganismos o por extracción de tejidos de animales y plantas. Las lipasas comerciales son comúnmente derivadas de microorganismos. Gracias a las técnicas de ingeniería genética, se ha incrementado el número de lipasas que se comercializan provenientes de bacterias y levaduras recombinantes. Por ejemplo, la “lipasa-detergente” del hongo *Humicola lanuginosa* es producida comercialmente a gran escala (varios cientos de toneladas por año) a través de la fermentación de *Aspergillus oryzae*, microorganismo en que fue clonado el gen que codifica para su lipasa. La tabla 1 muestra algunos ejemplos de lipasas comerciales.

**Tabla 1.** Algunas lipasas usadas en la industria.

Origen	Clave	M [kDa] (redondeado)
<b>De mamíferos</b>		
Lipasa pancreática humana	HPL	50
Lipasa gástrica humana	HGL	50
Lipasa pancreática porcina	PPL	50
<b>Fúngico</b>		
<i>Candida rugosa</i>	CRL	60
<i>Geotrichum candidum</i>	GCL	60
<i>Humicola lanuginosa</i>	HLL	30
<i>Rhizomucor miehei</i>	RML	30
<i>Aspergillus oryzae</i>	AOL	
<i>Penicillium camembertii</i>	PEL	30
<i>Rhizopus delemar</i>	RDL	41
<i>Rhizopus oryzae</i>	ROL	41

<i>Rhizopus arrhizus</i>	RAL	41
<b>Bacteriano</b>		
<i>Pseudomonas glumae</i>	PGL	33
<i>Burkholderia cepacia</i>	PCL/BCL	33
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	PPL	33
<i>Pseudomonas mendocina</i>	PML	33
<i>Chromobacterium viscosum</i>	CVL	33
<i>Bacillus thermocatenuatus</i>	BTL-2	43

Los principales productores de estas enzimas son Novo-Nordisk (Baegsvard, Dinamarca), Genencor International B.V. (Delft, Holanda), Boehringer-Mannheim (Mannheim, Alemania) y Amano Co. (Nagoya, Japon) (Schmid et al, 1998).

#### *E. Aplicaciones de las lipasas*

Las lipasas son ampliamente utilizadas en numerosas industrias por ejemplo, son usadas como aditivos en las formulaciones de detergentes para remover manchas de grasa. En 1994, Novo Nordisk presentó la primera lipasa comercial recombinante “Lipolasa”, proveniente del hongo *Thermomyces lanuginosus* y que fue expresada en *Aspergillus oryzae*.

En la industria de los alimentos, las lipasas han adquirido gran importancia ya que son empleadas para mejorar la textura untable de las grasas. Por medio de la catálisis con lipasas es posible la obtención de mono y diglicéridos los cuales tienen aplicaciones como emulsificantes y pueden ser usados, por lo tanto, como aditivos alimentarios. Además las lipasas han sido empleadas para el desarrollo del sabor durante la maduración del queso.

Por otro lado las lipasas son usadas en reacciones que involucran solventes orgánicos debido a que son estables en ellos, aceptan una amplia gama de sustratos, aparte de triglicéridos son capaces de utilizar ésteres alifáticos, cíclicos y aromáticos, pueden ser usadas libres o inmovilizadas, además de que presentan regio, quimio y enantioselectividad, esto último trae la posibilidad de producir compuestos enantioméricamente puros (Sharma et al, 2001).

#### *F. Importancia de los compuestos enantioméricos.*

Existe una relación directa entre quiralidad y vida. Los sistemas biológicos regulan sus procesos metabólicos de manera sensible a la estereoquímica obteniéndose actividades distintas dependiendo del enantiómero que se trate. Se conocen muchos ejemplos con diferencias notables en la actividad biológica de los enantiómeros en las moléculas quirales: componentes de fármacos, vitaminas, agentes agroquímicos, saborizantes, perfumes, etc.

Los enantiómeros son isómeros ópticos que tienen propiedades físicas y químicas idénticas, excepto por: 1) rotan la luz polarizada en direcciones opuestas y 2) reaccionan a diferentes velocidades con otros compuestos ópticamente activos.

Los organismos vivos contienen un gran número de moléculas quirales, es sabido que sólo los aminoácidos de configuración L están presentes en las proteínas y sólo los azúcares con configuración D constituyen los carbohidratos y los ácidos nucleicos de los seres vivos.

El conocimiento de la homoquiralidad, es decir, que sólo se presenten moléculas de una cierta configuración R o S, en las moléculas biológicas es de suma importancia. Así pues, las sustancias quirales existen como dos o más estereoisómeros, que deben de considerarse como compuestos diferentes desde el punto de vista de su actividad biológica. Por tal motivo, la preparación de compuestos enantiopuros se ha convertido en una importante área de investigación en diversas industrias, especialmente en la farmacéutica, ya que

mientras uno de los enantiómeros posea la actividad deseada el otro puede estar inactivo o ser tóxico (Suan et al, 2004). Por ejemplo, el ibuprofeno es un fármaco anti-inflamatorio ampliamente utilizado. Es comercializado principalmente como racemato. Sin embargo, se ha reportado que el (S)-ibuprofeno es 160 veces más activo que la forma (R). (Liu et al, 2009). Del mismo modo, se han observado comportamientos similares en compuestos que desempeñan funciones en la comunicación química entre los insectos.

En la naturaleza muchos compuestos que aportan sabores y aromas no se encuentran como racematos sino sólo como uno de los enantiómeros. Además, estos compuestos a menudo tienen un perfil sensorial según el enantiómero, lo cual es un punto interesante para la producción de compuestos específicos (Zawirska-Wojtasiak, 2006).

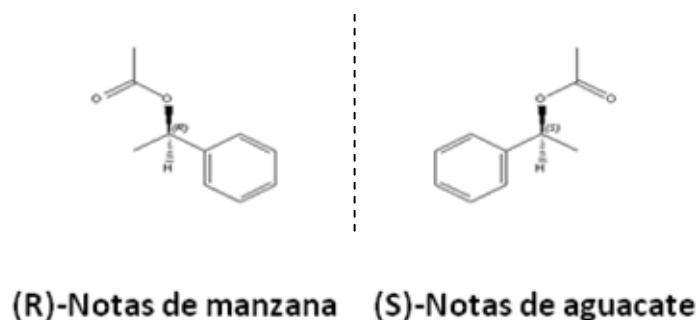
Desde finales del siglo XIX se descubrió que ciertos aminoácidos, tales como D-triptofano, D-fenilalanina, D-leucina, D-tirosina y D-asparagina poseen sabores dulces, mientras que sus enantiómeros (pertenecientes a la serie L) no poseen sabor o son amargos.

Desde los inicios de la química el avance en el conocimiento analítico y sintético permitió el aislamiento y la preparación de un gran número de aromas a escala industrial. Todos estos compuestos tienen una amplia aplicación en los alimentos, bebidas, cosméticos, detergentes y productos farmacéuticos. Y aunque la mayoría de estos productos eran preparados por síntesis química o por extracción a partir de plantas, el uso de nuevos procesos biotecnológicos se ha incrementado considerablemente. En este campo la biocatálisis representa una herramienta útil ya que permite que se lleven a cabo un gran número de reacciones regio y enantioselectivas que no son fácilmente logradas por procedimientos sintéticos clásicos (Vandamme, 2003; Serra et al, 2005).

### G. Características del producto de interés

Los ésteres se encuentran en casi todos alimentos y, especialmente, aquéllos con bajo peso molecular imparten aromas y sabores frutales. En las plantas, los ésteres se forman por lipasas y esterases a partir de aminoácidos o ácidos grasos. Estas enzimas también desempeñan un papel importante en la formación de ésteres a nivel industrial (Schrader et al, 2004). Las lipasas microbianas de *Mucor miehei*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus arrahisuis* y *Candida cylindracea* han sido aplicadas para la síntesis de ésteres de bajo peso molecular. Tanto ésteres, alifáticos como aromáticos se han sintetizado en sistemas orgánicos (Liaquat et al, 2000).

En el presente trabajo se buscó la síntesis de un compuesto a partir de otro que tuviera similitud con la estructura del sustrato natural de la enzima a estudiar (StcI de *Aspergillus nidulans*) y que por las propiedades de aroma que puede aportar, tuviera potencial en la industria de los alimentos, por tal motivo se eligió al 1-fenilacetato, compuesto quiral en el que cada uno de sus enantiómeros muestra características distintas. El (R) -1-Fenilacetato presenta notas frutales y florales de jazmín, mimosa, gardenia con chabacano, manzana y fresa. El (S)-1-Fenilacetato posee aroma a pasto fresco, aguacate y notas de fresa (Figura 6). Dadas estas diferencias este trabajo pretende la síntesis de sólo uno de los isómeros, el cual pueda tener aplicaciones en la industria de los alimentos.



**Figura 6.** Enantiómeros del 1-Fenilacetato (Farbood et al, 2003).

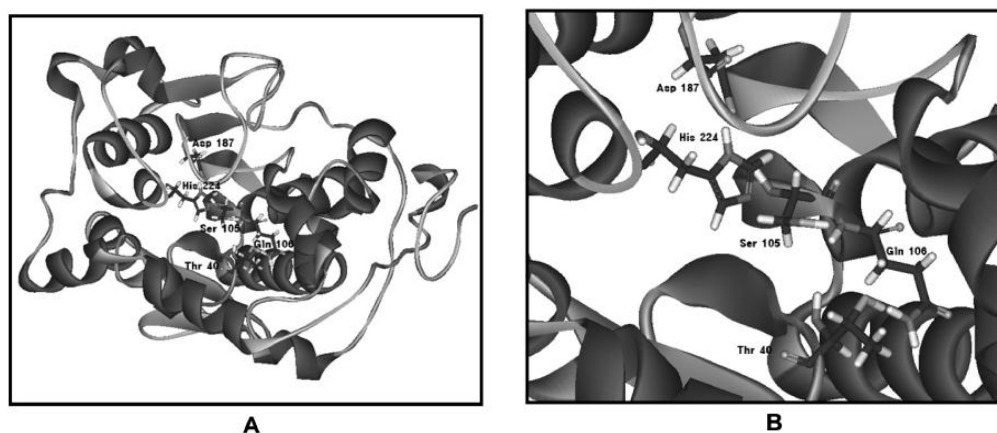


### *H. Lipasa B de Candida antarctica*

La lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) ha sido ampliamente estudiada y usada en numerosas aplicaciones ya que presenta tanto en soluciones acuosas como orgánicas elevada actividad y estabilidad. Además, exhibe un muy alto grado de regio- y enantioselectividad, en particular hacia alcoholes secundarios (Magnusson et al, 2005). Se emplea en un gran número de reacciones de síntesis debido a que acepta una amplia variedad de sustratos. Tiene un peso molecular de 33 kDa, no presenta activación interfacial e hidroliza triglicéridos de cadena larga lentamente (Bornscheuer et al, 2006).

CALB ha sido expresada exitosamente en diversos hospederos como; las levaduras *Pichia pastoris* (Rotticci-Mulder et al, 2001) y *Saccharomyces cerevisiae* (Inaba et al, 2009) y en el hongo *Aspergillus oryzae* (Tamalampudi et al, 2007).

La preparación industrial de CALB es conocida como Novozyme 435 (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) y Chirazyme L-2 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) y se encuentran de manera inmovilizada (Kato et al, 2007). Hoy en día el principal factor que limita el uso de CALB es probablemente el elevado costo del producto (Sun et al, 2010). La figura 7 muestra el sitio activo de CALB.



**Figura 7.** Estructura del sitio activo de la lipasa B de *Candida antarctica*. (A) Estructura completa, (B) Acercamiento al sitio activo (Kwon et al, 2007).

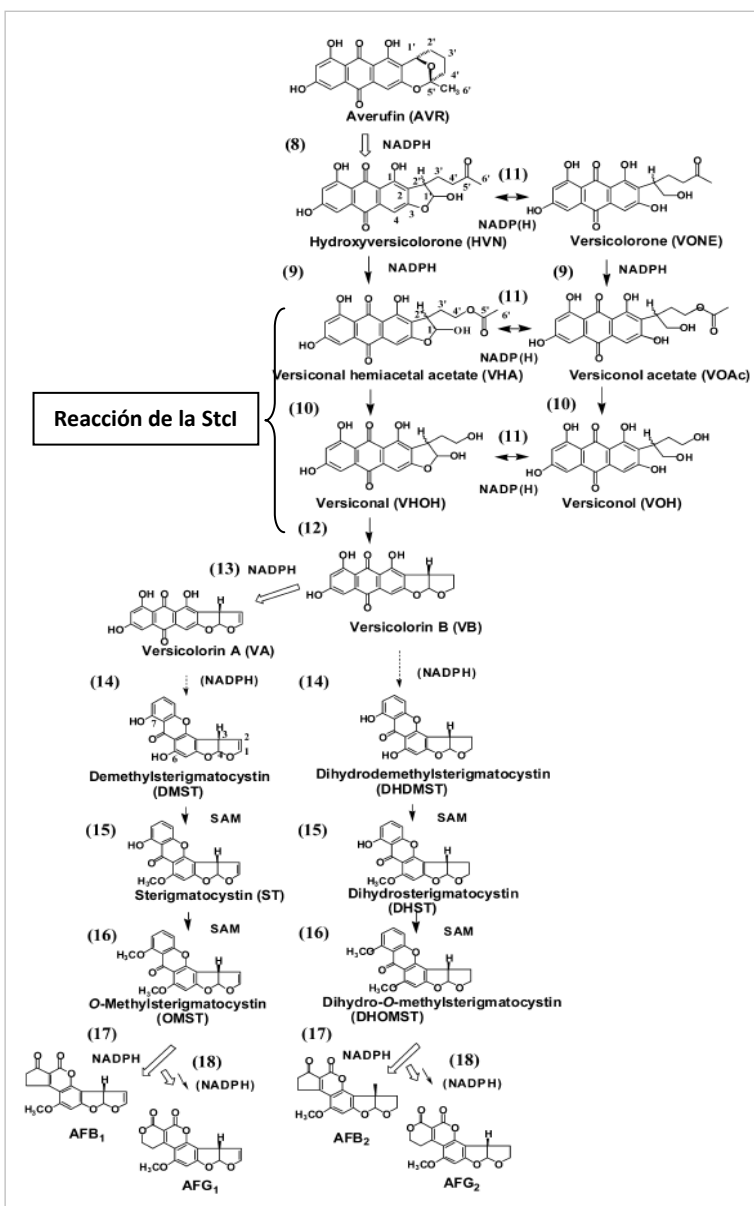
### *I. Carboxilesterasas en Aspergillus nidulans*

Los hongos filamentosos son una fuente importante de enzimas para la industria. Las especies más productivas pertenecen a los géneros *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Aspergillus* y *Penicillium* (da Silva et al, 2008). Entre estos, los miembros del género *Aspergillus* han sido ampliamente usados en procesos biotecnológicos.

El género *Aspergillus* comprende un grupo diverso de hongos filamentosos que abarcan más de 200 millones de años de evolución. A pesar de pertenecer al mismo género, las especies de *Aspergillus* presentan diferencias importantes. Entre más de 185 especies de este género existen varias que tienen un impacto sobre la salud humana, 20 de estas son consideradas patógenas de humanos, sin embargo también cuenta con especies benéficas usadas para la producción de enzimas industriales y productos alimenticios. *Aspergillus nidulans* es una de las especies más estudiadas de este género y se encuentra relacionado cercanamente a otras especies patogénicas de *Aspergillus* como, *A. fumigatus* (Galagan et al, 2005).

Diversos autores han realizado estudios en *A. nidulans* para identificar potenciales carboxilesterasas, obteniéndose el reporte de diversas enzimas que hidrolizan enlaces éster. Machado y de Castro-Prado (2001) reportaron en este microorganismo la expresión de diferentes esterasas. También han sido detectadas actividades cutinolíticas y lipolíticas por García- Lepe y Reyes (1997).

*Aspergillus nidulans* produce la esterasa StcI, la cual está involucrada en la síntesis de esterigmatocistina (ST). La esterigmatocistina es una molécula precursora de aflatoxinas. En esta ruta biosintética la esterasa StcI convierte versiconal hemiacetal acetato (VHA) a versiconal (VHOH) y versiconol acetato (VOAc) a versiconol (VOH) (Figura 8) (Yabe et al, 2004)). La naturaleza de la reacción catalizada por esta enzima, sugiere que la StcI puede presentar un potencial biocatalítico para llevar a cabo reacciones con sustratos cíclicos en los que puede mostrar cierta enantioselectividad.



**Figura 8.** Ruta biosintética en donde participa la esterasa StcI (Yabe et al, 2004)

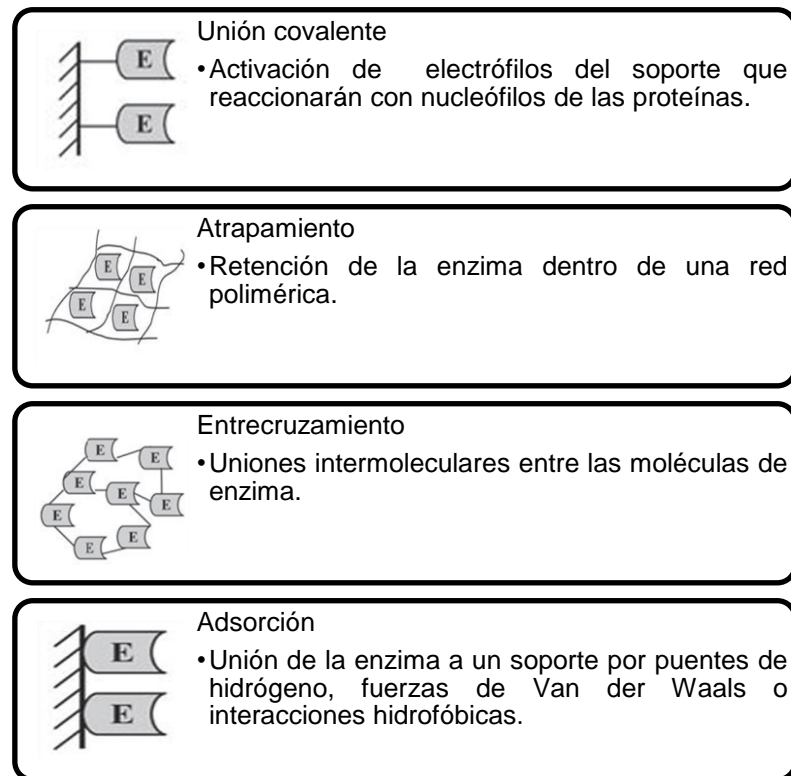
### J. Inmovilización de enzimas

A pesar de las ventajas del empleo de enzimas, su uso llega a verse limitado en los procesos químicos industriales debido a que muchas enzimas no son estables en las condiciones de trabajo. Por otra parte, su separación de los sustratos y

productos es difícil, y por tanto, no se pueden reutilizar. La inmovilización de enzimas ofrece la posibilidad de superar estos inconvenientes.

La inmovilización consiste en la asociación de la enzima a una matriz insoluble, en donde sea capaz de retener una geometría apropiada para mantener su poder catalítico. Las técnicas de inmovilización se pueden dividir en las categorías indicadas en la figura 9 (Bornscheuer et al, 2006).

Existe una gran variedad de soportes para la inmovilización de enzimas y pueden ser clasificados de acuerdo a su composición química (Tabla 4). La elección del soporte, así como de la técnica, dependen de la naturaleza de la enzima y de la aplicación.



**Figura 9.** Principales métodos de inmovilización de enzimas (Guisan, 2006; Arroyo, 1998).

**Tabla 4.** Clasificación de los soportes para la inmovilización de enzimas (Guisan, 2006).

<b>Orgánicos</b>
<p><b>Polímeros naturales</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Polisacáridos: celulosa, dextranos, agar, agarosa, alginatos, quitina.</li> <li>• Proteínas: colágeno, albúmina.</li> </ul> <p><b>Polímeros sintéticos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Poliestireno</li> <li>• Otros polímeros: poliacrilamida, poliamidas, polipropileno.</li> </ul>
<b>Inorgánicos</b>
<p><b>Minerales naturales:</b> sílica, bentonita.</p> <p><b>Materiales procesados:</b> metales, vidrio (tamaño de poro controlado).</p>

Las lipasas son usualmente inmovilizadas por uniones covalentes y por adsorción en soportes iónicos e hidrofóbicos. Debido a la presencia de una superficie hidrofóbica alrededor del sitio activo, la inmovilización de lipasas sobre soportes hidrofóbicos es considerada de gran ventaja, ya que asegura: 1) la hiperactivación de la mayoría de las lipasas; 2) una adsorción altamente selectiva, la cual en algunos casos trae consigo la purificación y 3) mayor enantioselectividad. El mecanismo por el cual las lipasas son adsorbidas sobre soportes hidrofóbicos es diferente del que usan la mayoría de las proteínas: las lipasas son más fácilmente adsorbidas a fuerzas iónicas bajas, mientras que otras proteínas necesitan de fuerzas iónicas altas. Estas diferencias en el mecanismo de adsorción permiten a las lipasas ser separadas de las otras proteínas del extracto (Volcan-Almeida et al, 2008).

### *1. Ventajas y desventajas*

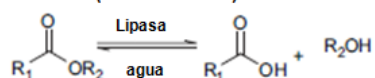
Las enzimas inmovilizadas tienen varias ventajas sobre las enzimas libres como el aumento de la estabilidad de la enzima frente a la temperatura y pH, la prevención de formación de agregados en medios orgánicos, la fácil recuperación

y separación del biocatalizador lo que hace posible el ser reutilizado disminuyendo los costos del proceso (Kolling et al, 2010). Sin embargo, también es posible que se presenten algunos inconvenientes, como la alteración de la conformación de la enzima respecto a su estado nativo, limitación del acceso del sustrato al sitio activo; lo que trae consigo una pérdida de la actividad catalítica (Guisan, 2006), además de que se puede presentar cierta heterogeneidad del sistema enzima-soporte en donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un número diferente de uniones al soporte, adicionalmente el biocatalizador es más caro que la enzima nativa (Arroyo, 1998).

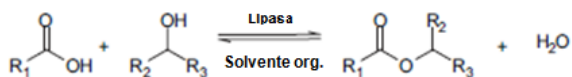
## 2.2 Enzimas como biocatalizadores en medios orgánicos

Algunos compuestos comercialmente importantes deben ser sintetizados en solventes orgánicos debido a que son inestables o insolubles en un medio acuoso. Del mismo modo, cuando los sustratos de una enzima son insolubles en agua, es deseable llevar a cabo la reacción en un medio orgánico ya que la velocidad de esta se ve notablemente incrementada por la solubilización de los sustratos (Ogino et al, 2001). Además, las enzimas hidrolíticas, como lipasas y esterasas, son capaces de catalizar una gran variedad de reacciones como esterificaciones y transesterificaciones que en agua no serían posibles (Figura 10).

### 1. Hidrólisis (medio acuoso)

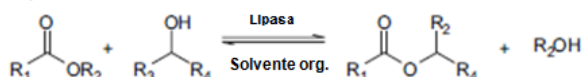


### 2. Esterificación (medio orgánico)

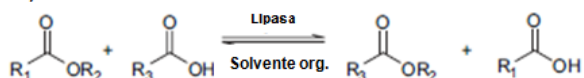


### 3. Transesterificación

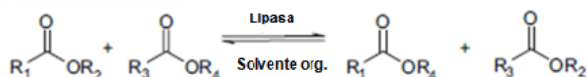
#### a) alcoholólisis



#### b) acidólisis



### 4. Interesterificación



**Figura 10.** Algunas reacciones catalizadas por lipasas (Ghanem, 2007).

Aunque las enzimas en medios orgánicos muestran numerosas ventajas, es posible que se presenten diferentes comportamientos como limitaciones difusionales, saturación por altas concentraciones de sustrato, reducción en la flexibilidad de la proteína, baja estabilidad del intermediario enzima-sustrato (Secundo et al, 2002) e inhibición competitiva por parte del solvente (Graber et al, 2007).

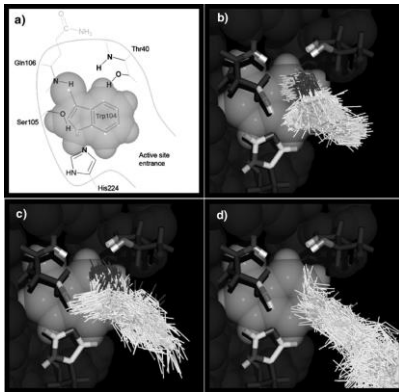
#### *A. Conformación de la proteína*

La estabilidad de la proteína en medios orgánicos se debe al incremento en las interacciones intramoleculares que se establecen, como puentes de hidrógeno, interacciones iónicas e hidrofóbicas. Sin embargo, estas interacciones originan una disminución en la flexibilidad de la proteína, lo cual puede ser considerado como un factor importante en la reducción de la actividad enzimática: si la enzima es más rígida debido a todas las interacciones que se generan en su interior, el sitio activo se puede encontrar menos accesible al sustrato (Colombo et al, 2002).

#### *B. Inhibición competitiva*

Las moléculas de distintos solventes pueden presentar diferente habilidad para unirse al sitio activo de la enzima, en donde pueden actuar como inhibidores competitivos del sustrato, y por lo tanto provocar una disminución en la actividad catalítica. Graber et al. (2007) estudiaron la reacción de transesterificación entre el metil propanoato y el 1-propanol con CALB, para lo cual emplearon distintos solventes que presentaran similar peso molecular, pero diferentes grupos funcionales. Sus resultados muestran que al incrementar la polaridad del solvente la actividad enzimática disminuye. Tales resultados fueron apoyados con estudios de modelado molecular, en estos, los solventes más polares (una cetona y un alcohol terciario) mostraron una clara afinidad por el sitio activo, durante la simulación ambos solventes permanecieron unidos al sitio activo por puentes de hidrógeno al hoyo oxianión y/o a la serina catalítica, dificultando la entrada del sustrato al sitio activo. Por otro lado, el solvente de menor polaridad (un alcano) no presentó afinidad por el sitio catalítico (Figura 11). Además, durante la

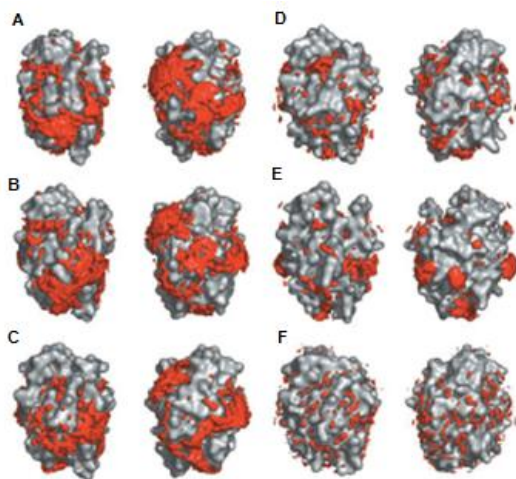
simulación, no se observaron cambios conformacionales significativos en la estructura de la enzima.



**Figura 11.** (a) Sitio activo de CALB. (b) 2-metil-2-pentanol unido al sitio activo. (c) 2-pentanona unida al sitio activo. (d) 2-metil pentano presenta menos atracción hacia el sitio activo (Graber et al, 2007).

### C. Efecto del contenido de agua

Las enzimas deben de retener una capa esencial de agua para mantener una adecuada estructura tridimensional, por lo tanto, la actividad de la enzima está en función del contenido de agua, y la cantidad requerida para que la actividad enzimática sea la máxima depende de cada enzima, del soporte donde esta inmovilizada y del solvente utilizado (Camacho-Páez et al, 2003). Los solventes no polares son usualmente mejores debido a que estos no afectan la capa de agua, mientras que solventes polares retiran esta capa esencial y de este modo inactivan al biocatalizador (Figura 12) (Bornscheuer et al, 2006).



**Figura 12.** Probable distribución espacial del agua sobre una cutinasa de *Fusarium solani* en diferentes solventes. (A) Hexano, (B) Éter diisopropílico, (C) 3-pentanona, (D) Etanol, (E) Acetonitrilo con 25% de agua y (F) Agua (Nuno et al, 2007).



No existe una guía para la selección de un solvente orgánico para un proceso en particular. El criterio más importante es la compatibilidad del solvente con el mantenimiento de la actividad de la enzima y de su estabilidad. El principal parámetro relacionado con la polaridad de los solventes es el logaritmo del coeficiente de partición en un sistema octanol/agua ( $\log P$ ). Este parámetro da una medida del comportamiento de la solubilidad del solvente, y por lo tanto representa una guía de la capacidad que tendrá dicho solvente para disolver la capa acuosa presente en la enzima (Camacho-Páez et al, 2003). La tabla 3 muestra el valor  $\log P$  de algunos solventes (Suan et al, 2006).

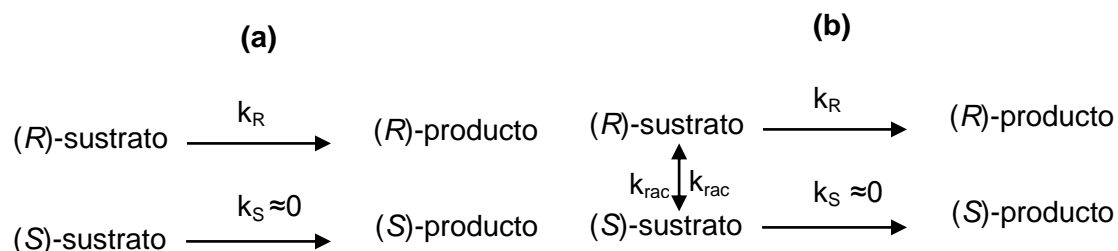
**Tabla 3.** Valores de  $\log P$  de algunos solventes

Solvente	$\log P$
Éter metil <i>tert</i> -butílico	1.4
Tolueno	2.5
Ciclohexano	3.2
Hexano	3.5
Heptano	4.0
Isooctano	4.5

### 2.3 Resoluciones cinéticas

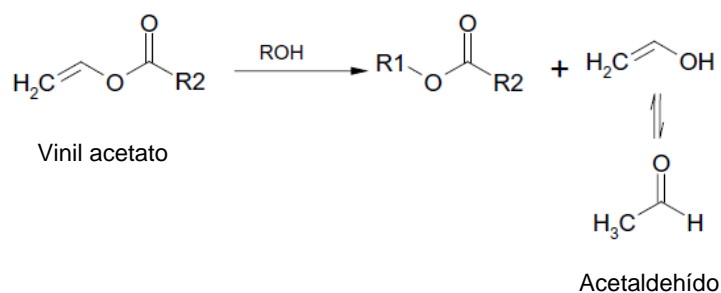
Uno de los métodos empleados para la obtención de compuestos enantioméricamente puros es la resolución cinética de racematos catalizada por lipasas en solventes orgánicos. Una resolución cinética se puede realizar cuando  $k_R$  y  $k_S$  son considerablemente diferentes. En estos casos un enantiómero reacciona mucho más rápido que el otro, por ejemplo, si el reactivo (R) es el único enantiómero que reacciona,  $k_S=0$ . Esto produce una mezcla final de 50% de reactivo (S) y 50% de producto (P). Por lo tanto una resolución cinética alcanza un máximo de 50% del enantiómero deseado. Para lograr rendimientos más altos, el enantiómero no deseado puede ser racemizado durante la resolución cinética, y

de este modo los sustratos (*R*) y (*S*) se encontrarán en equilibrio, siendo ahora posible obtener un 100% de rendimiento de producto enantiopuro a partir de una mezcla racémica (Figura 13).



**Figura 13.** (a) Resolución cinética convencional (conv. máx.50%). (b) Resolución cinética dinámica con rendimiento teórico de 100% (Ghanem et al, 2004).

En las resoluciones cinéticas de alcoholes racémicos por transesterificación, los donadores de acilos adecuados son los enol ésteres como vinil acetato o isopropenil acetato. Cuando se usa vinil acetato el alcohol vinílico formado como subproducto, sufre una tautomerización ceto-enol lo que genera el correspondiente compuesto carbonílico (acetaldehído) y de este modo la reacción se vuelve irreversible (Figura 14).



**Figura 14.** Transesterificación irreversible con vinil acetato (Ghanem et al, 2004).

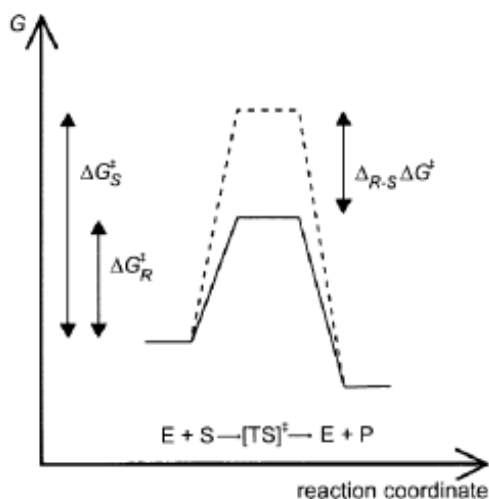
### A. Enantioselectividad

La enantioselectividad es una propiedad de gran importancia que pueden presentar las enzimas y es la base de numerosas aplicaciones para la preparación de alcoholes y ésteres ópticamente puros. En una reacción enantioselectiva catalizada por una enzima es importante considerar el exceso enantiomérico (ee) (ecuación 1), la relación enantiomérica (E) (ecuaciones 2 y 3) y el grado de conversión (c) (ecuación 4).

$$\%ee = \frac{\text{enantiómero 1} - \text{enantiómero 2}}{\text{enantiómero 1} + \text{enantiómero 2}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

En donde enantiómero 1 se refiere a la concentración del enantiómero que se encuentra mayoritariamente y enantiómero 2 a la concentración del enantiómero que se encuentra en menor proporción. De este modo es como se puede obtener el exceso enantiomérico del producto ( $ee_p$ ) y del sustrato ( $ee_s$ ). Por lo tanto, para un compuesto racémico, el valor de ee es cero mientras que para un compuesto enantioméricamente puro el valor de ee es 1 (o 100% ee) (Ghanem et al, 2004).

Todas las reacciones enantioselectivas se basan en la formación de un complejo diastereoisomérico entre el reactivo quiral y la enzima, donde la energía del estado de transición del complejo ( $\Delta G^{\ddagger}$ ) con un isómero y otro es diferente (Figura 13).



**Figura 13.** Diferencia en la energía libre entre los estados de transición de los enantiómeros, en este ejemplo el enantiómero R es el favorecido (Ghanem, 2007).

Si los dos enantiómeros compiten por el centro activo de la enzima, la “relación de enantioselectividad” (E) se puede definir como la relación existente entre las velocidades de reacción de los dos enantiómeros. Por lo tanto, también está relacionada con los parámetros  $k_{cat}$  y  $K_M$  de cada uno de ellos.

$$E_{RS} = \frac{(k_{cat}/K_M)_R}{(k_{cat}/K_M)_S} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde  $k_{cat}$  es la constante de velocidad y  $K_M$  es la constante de Michaelis-Menten.

E también puede ser expresada en términos de los excesos enantioméricos del sustrato y del producto ( $ee_s$  y  $ee_p$ ), de acuerdo a la siguiente ecuación (Ghanem et al, 2004):

$$E = \frac{\text{Ln} \left[ \frac{1 - ee_s}{1 + (ee_s/ee_p)} \right]}{\text{Ln} \left[ \frac{1 + ee_s}{1 + (ee_s/ee_p)} \right]} \quad \text{Ecuación 3}$$

Una reacción no selectiva tiene una E de 1, mientras que resoluciones con valores de E por encima de 20 son las consideradas útiles para reacciones de síntesis (Bornscheuer et al, 2006).

Finalmente el grado de conversión está definido por la siguiente ecuación:

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde  $ee_s$  es el exceso enantiomérico del sustrato y  $ee_p$  el exceso enantiomérico del producto.

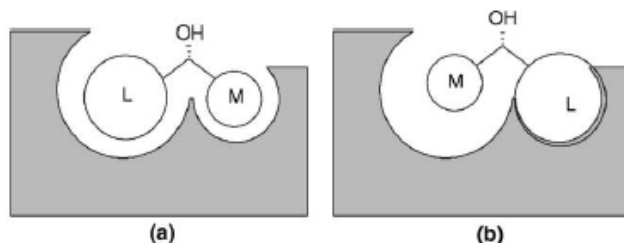
Las enzimas son fuertemente afectadas por la elección del solvente. Se ha reportado incluso cambios en la magnitud de la enantioselectividad y en la enantiopreferencia debido a cambios en el solvente. Por ejemplo la enantioselectividad de la alfa-quimiotripsina en la transesterificación del metil 3-hidroxi-2-fenilpropionato con propanol cambio en un rango de 20 veces cambiando de un solvente a otro (Klibanov, 2001). En una reacción de hidrólisis la enantioselectividad de una lipasa de *Pseudomonas* (lipasa AH) se invirtió con el cambio de solvente: en éter diisopropílico fue selectiva para el isómero (S) mientras que en ciclohexano prefirió al (R) (Berglund, 2001).

Por lo tanto, la elección del medio de reacción (ingeniería de solventes) provee una estrategia para el mejoramiento de la enantioselectividad de una enzima, ya que una de las metas para los químicos orgánicos, es controlar dicho parámetro como función de las condiciones de reacción.

#### *B. Resolución cinética de alcoholes secundarios*

A pesar de que las lipasas muestran elevada enantioselectividad hacia una amplia gama de sustratos, los alcoholes secundarios son por mucho los más frecuentemente utilizados como sustratos en resoluciones catalizadas por lipasas. Esto es debido no sólo a su importancia en síntesis orgánica sino también a que las lipasas usualmente muestran mayor enantioselectividad hacia estos alcoholes en comparación con alcoholes primarios y terciarios. Es probable que esto se deba a que los alcoholes primarios y terciarios se acomodan con dificultad al sitio activo de las lipasas.

A fin de predecir cuál de los enantiómeros de una mezcla racémica reaccionará con mayor velocidad en una reacción enzimática, se puede emplear la regla de Kazlauskas, la cual predice la enantiopreferencia hacia cierto sustrato, sin embargo no predice el grado de enantioselectividad. Esta regla está basada en los tamaños de los sustituyentes del sustrato, y sugiere como modelo del sitio activo de las lipasas dos espacios de diferente tamaño (Ghanem et al, 2004; Jing et al, 2008).



**Figura 16.** Modelo del sitio activo de las lipasas derivado de la regla de Kazlauskas. (a) corresponde al enantiómero que reacciona más rápido y (b) al que reacciona lentamente (Ghanem et al, 2004).

La estereoselectividad está relacionada con la presencia de un sustituyente grande y uno pequeño, por ejemplo cuando un alcohol secundario es el sustrato en una resolución catalizada por una lipasa, el enantiómero que reacciona más rápido se une al sitio activo del modo que indica la figura 16 (a), sin embargo, cuando el otro enantiómero reacciona con la lipasa, éste es forzado a acomodar el sustituyente de mayor tamaño dentro del espacio pequeño (Figura 16 (b)). Por lo tanto, los impedimentos estéricos son un factor importante a considerar al momento de determinar la enantioselectividad de las enzimas (Bornscheuer et al, 2006).

### *C. Métodos analíticos para evaluar una resolución cinética*

En una resolución cinética de una mezcla racémica es necesario la evaluación de la enantioselectividad (E), el exceso enantiomérico (ee) y la conversión (c). Entre los métodos analíticos para la determinación de dichos parámetros se encuentran: 1) polarimetría, 2) cromatografía de gases, 3) cromatografía de líquidos y 4) resonancia magnética nuclear. Los métodos más prácticos y con mayor sensibilidad son la cromatografía de gases quiral y HPLC.

### Cromatografía de gases (CG)

Esta técnica presenta gran sensibilidad, sólo requiere de un pequeño volumen de la muestra a analizar, además de que no se ve afectada por la presencia de impurezas en el medio de reacción. Por lo tanto, no se requiere de la purificación de la muestra analizada.

Este método está basado en un reconocimiento quiral llevando a una separación enantiomérica cuando una fase estacionaria quiral (por ejemplo, ciclodextrinas) es usada en CG. El gas (fase móvil, por ejemplo; hidrógeno, helio, nitrógeno) acarrea al analito quiral a través de la fase estacionaria. Los enantiómeros experimentan interacciones diastereoméricas rápidas y reversibles con la fase estacionaria quiral y por lo tanto pueden ser eluidos a diferentes tiempos. Este método presenta un alto grado de precisión y pueden ser detectados excesos enantioméricos (ee) por arriba de 99%.

### HPLC

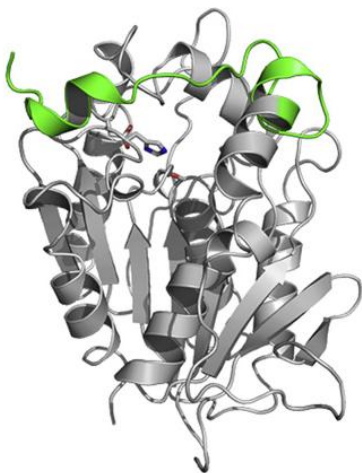
La técnica de HPLC sigue los mismos principios y ventajas que el análisis con CG. La principal diferencia es que es posible el análisis de compuestos más polares (Ghanem et al, 2004).

### 3. ANTECEDENTES

#### A. Modelo estructural de la esterasa Stcl

Dentro del grupo de trabajo el gen (*stcl*) completo que codifica para la esterasa Stcl y que incluye una región N-terminal, fue aislado de *Aspergillus nidulans*, y posteriormente clonado y expresado en *Pichia pastoris* (Peña-Montes et al, 2009).

Según el análisis en las secuencias, la enzima Stcl presenta los residuos de aminoácidos típicos de la triada catalítica encontrados en las  $\alpha/\beta$  hidrolasas (Ser-152, Asp-255, His-285), y los residuos de aminoácidos del hoyo oxianión (Gly-86 y Ala-153). La región N-terminal está compuesta por 29 aminoácidos y se encuentra en forma de  $\alpha$ -hélice cubriendo el sitio activo (Figura 17). De acuerdo al análisis en gel SDS-PAGE la Stcl presenta una masa molecular de 35 kDa.



**Figura 17.** Modelo estructural de la esterasa Stcl. Los 29 aminoácidos que forman la  $\alpha$ -hélice se encuentran en verde. La triada catalítica y el hoyo oxianión se muestran en azul y rojo. (Peña-Montes et al, 2009).

#### B. Caracterización de la enzima libre

La enzima fue expresada en un medio al cual le es adicionado metanol como inductor, posteriormente las células fueron eliminadas por centrifugación. Se



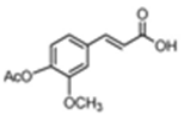
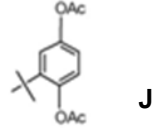
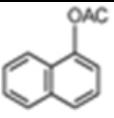
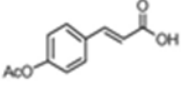
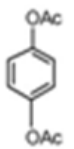
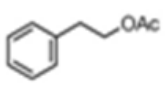
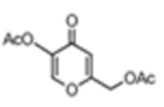
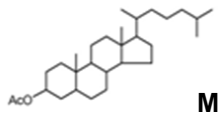
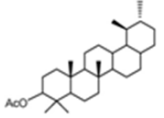
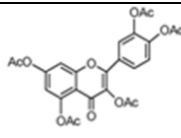
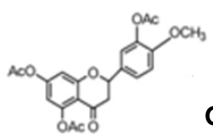
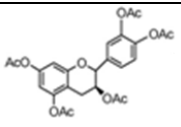
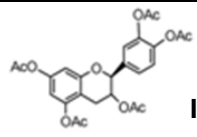
empleó como control negativo a la cepa silvestre X-33, se demostró que *Pichia pastoris* no produce ninguna enzima con actividad de esterasa. El extracto concentrado se utilizó para estudiar el efecto de la temperatura y se observó que la esterasa StcI posee mayor actividad en un rango de temperatura de 30-50°C a un pH de 7.5, y presenta la máxima actividad a 40°C. Se evaluó su termoestabilidad midiendo la actividad residual después de 30 minutos de incubación a un pH de 7.5. La enzima retuvo el 70% de su actividad a 40°C. Sin embargo, cuando la temperatura se elevó a 50°C la enzima perdió el 50% de la actividad inicial.

Se evaluó el efecto del pH con *p*-nitrofenilacetato (*p*-NPA) durante 30 min a 37°C, en un rango de pH de 5 a 10, lo que resultó en una mayor actividad enzimática en un intervalo de pH de 7 a 9, con un máximo en este último valor.

Por otra parte se estudió la capacidad de la enzima para hidrolizar ésteres de nitrofenilo con ácidos grasos de diferente largo de cadena (C2:0-C18:0). La esterasa StcI mostró la mayor actividad utilizando *p*-NPA (C2:0) como sustrato.

### *C. Reacciones de desacetilación*

Adicionalmente se estudiaron reacciones de hidrólisis empleando compuestos que presentaran una estructura similar al VHA (sustrato original). El grado de conversión fue monitoreado cuantificando la cantidad de sustrato y producto por HPLC. En general se observan los rendimientos más altos hacia los flavonoides. Los resultados obtenidos son mostrados en la figura 18 (Peña-Montes et al, 2009).

Estructura	% conversión	Estructura	% conversión
 <b>A</b>	96	 <b>J</b>	0
 <b>B</b>	100	 <b>K</b>	0
 <b>C</b>	100	 <b>L</b>	0
 <b>D</b>	75	 <b>M</b>	0
 <b>E</b>	47		
 <b>F</b>	95		
 <b>G</b>	100		
 <b>H</b>	100		
 <b>I</b>	60		

**Figura 18.** Sustratos usados para la reacción de desacetilación catalizada por la StcI en 48 h a 37°C. Compuesto liberado por la hidrólisis: A) Ácido ferúlico, B)  $\alpha$ -Naftol, C) Hidroquinona D) Ácido kójico, E)  $\beta$ -Amirina, F) Quercetina, G) Hesperetina, H) (+) Catequina, I) (-) Epicatequina, J) TBHQ (tert-butil hidroquinona), K) Ácido cumárico, L) Fenil etanol, M) Dihidrocolesterol. (Peña-Montes et al, 2009).

#### *D. Inmovilización de la enzima y su caracterización*

Para inmovilizar a la enzima se utilizó un soporte microporoso de polipropileno (Accurel MP 1000). Las condiciones de inmovilización se establecieron a una relación de 0.002 mg de proteína por cada mg de soporte, a 4°C y 24 horas con lo que se generó un biocatalizador con 0.5256 U por mg de soporte.

Se caracterizó al inmovilizado en términos de temperatura y pH. Al igual que con la enzima libre, se obtuvo mayor actividad a pH 9. Para conocer el efecto de la temperatura se evaluó la actividad a un pH de 7.5 a 25 y 37° C, se presentó la mayor actividad a 37° C, lo cual es un valor muy aproximado a los 40 °C reportados para la enzima sin inmovilizar.

En un medio acuoso se evaluó la estabilidad tras la incubación del biocatalizador a 25, 37 y 50°C por 30 minutos, la esterasa Stcl inmovilizada incrementó su estabilidad a un pH de 7.5 después de su incubación a 37°C y, a diferencia de la enzima libre, la estabilidad aumentó cuando la temperatura subió a 50°C. (Real Cuatle, 2010).

## 4. JUSTIFICACIÓN

El uso de las enzimas en ambientes diferentes a los naturales (acuosos) posibilita un incremento en sus aplicaciones en reacciones de síntesis química. En consecuencia, se puede aprovechar mejor todo su potencial catalítico como su estereoespecificidad, siendo posible la producción de compuestos enantioméricamente puros a partir de precursores racémicos por medio de resoluciones cinéticas. Es sabido que enzimas como las lipasas y esterases pueden ser empleadas como catalizadores quirales y llegar a presentar elevada enantioselectividad. Por otro lado, la evaluación de nuevas enzimas es importante para ampliar la disponibilidad de biocatalizadores que logren ofrecer mejores beneficios (por ejemplo incrementar rendimientos de reacción).

En el presente trabajo, se empleó como biocatalizador a la esterasa StcI de *Aspergillus nidulans*, la cual actúa naturalmente sobre sustratos aromáticos en la vía de síntesis de esterigmatocistina, por lo tanto se decidió investigar su potencial enantioselectivo empleando un sustrato quiral que presentara características estructurales aromáticas y que contará con un potencial en la industria de producción de aromas. El modelo de reacción elegido fue la conversión de 1-feniletanol a 1-fenilacetato optando por una transesterificación sobre una esterificación directa ya que esta última genera agua como subproducto, la cual puede afectar el equilibrio de la reacción. Se busca la síntesis de un sólo enantiómero, dado que cada isómero aporta aromas distintos, la forma (R) presenta notas de manzana y fresa, mientras que la (S) de pasto fresco y aguacate.

## 5. HIPÓTESIS

Es sabido que la enantioselectividad de una enzima en un medio orgánico depende de varios factores como por ejemplo la naturaleza polar del solvente, y aunque se sabe que los más hidrofóbicos suelen favorecer la actividad enzimática cada caso puede variar, es por esto la relevancia de evaluar cada biocatalizador en particular. Otro factor que puede llegar a modificar las propiedades enantioselectivas es el contenido de agua presente en el medio, ya que las enzimas requieren de una cantidad mínima de agua para mantener una conformación activa, es importante el considerar este parámetro en una reacción enzimática de síntesis. De acuerdo a lo anterior se plantea la siguiente hipótesis.

Se observará diferente enantioselectividad en la resolución de la mezcla racémica del 1-Feniletanol por parte de la enzima inmovilizada StcI de *Aspergillus nidulans*, si se modifica el contenido de agua en el medio, así como si se emplean solventes con diferente grado de polaridad ya que la reacción se favorecerá con el más hidrofóbico.

## 6. OBJETIVOS

### A. General

Determinar la enantioselectividad de la esterasa StcI inmovilizada de *Aspergillus nidulans* expresada en *Pichia pastoris* en la resolución del (R, S)-1-Feniletanol, y conocer el efecto sobre esta propiedad si se cambian el contenido de agua del medio de reacción y el solvente.

### B. Específicos

- Expresar e inmovilizar a la esterasa StcI de acuerdo a lo realizado previamente en el grupo de trabajo.
- Establecer las condiciones en términos de solvente/temperatura, que permitan al biocatalizador inmovilizado conservar la mayor actividad.
- Determinar las condiciones óptimas de reacción que permitan obtener la mayor conversión y enantioselectividad.
- Comparar el resultado obtenido de la esterasa StcI con respecto a la enzima comercial Novozym 435 (lipasa B de *Candida antarctica*) en la reacción estudiada.

## 7. REACTIVOS

Reactivo	Marca
Accurel MP 1000	Membrana Underlining Performance
Ácido clorhídrico	Baker
Ácido tricloroacético	Baker
Acrilamida/bisacrilamida	BioRad
Acetato de etilo	Sigma
Acetona	Sigma-Aldrich
Alfa naftil acetato	Sigma
Anhídrido acético	Baker
Biotina	Sigma
Borohidruro de sodio	Baker
Cloruro de magnesio	Baker
Cloruro de sodio	Baker
Desoxicolato de sodio	Bioxon de México
Dextrosa	Baker
Etanol	Tecsiquim
Éter diisopropílico	Merck
Extracto de levadura	Oxoid
Fosfato de potasio dibásico	Baker
Fosfato de potasio monobásico	Baker
Glicerol	Baker
Hexano	Baker
Kit para tinción de plata	Fermentas
Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	Novozym 435
Malla molecular 4 Å	Sigma

<b>Reactivo</b>	<b>Marca</b>
Marcador de peso molecular	Fermentas
Membrana con límite de 10kDa	Milipore
Metanol	Sigma
Peptona	Bacto
Piridina	Aldrich
<i>p</i> -nitrofenil acetato	Sigma
Reactivos para electroforesis	BioRad
Sulfato cérico	Sigma
Sulfato de sodio anhidro	Sigma
<i>Tert</i> - butanol	Baker
Tritón X-100	Sigma
Vinil acetato	Sigma-Aldrich



## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Reactivación del microorganismo

Para obtener la enzima StcI recombinante se utilizó como medio de expresión a *Pichia pastoris*. Se usó una cepa clonada previamente dentro del grupo de trabajo (Peña-Montes, et al 2009), que se encontraba en glicerol a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Esta fue reactivada en medio YPD de acuerdo a lo descrito en el manual “EasySelect *Pichia* expression kit (Version G)” (Invitrogen) y, la tabla 4 muestra su composición.

Tabla 4. Composición del medio YPD.

Componente	Concentración
<b>Extracto de levadura</b>	1%
<b>Peptona</b>	2%
<b>Dextrosa (glucosa)</b>	2%

La glucosa se esterilizó por filtración y los demás componentes se esterilizaron con autoclave (SM300, Yamamoto) a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Una vez esterilizados, los componentes se mezclan en las cantidades necesarias para obtener la concentración indicada.

Se inocularon 200  $\mu\text{L}$  de la cepa *Pichia pastoris* que se encontraba a  $-70^{\circ}\text{C}$  en tubos de ensayo estériles con 5 mL de medio YPD estéril y se incubaron por 24 horas a  $30^{\circ}\text{C}$  y 300 rpm de agitación orbital en una incubadora New Brunswick Scientific.

### B. Generación de biomasa

Se prepararon 500 mL de medio BMGY (Buffered Glycerol-complex medium), cuya composición se muestra en la tabla 5.

**Tabla 5.** Composición del medio BMGY.

Componente	Solución stock	Concentración
<b>Extracto de levadura</b>	-----	1 %
<b>Peptona</b>	-----	2 %
<b>Buffer de fosfatos de potasio, pH 6.0</b>	1 M	100 mM
<b>YNB</b>	10X (13.4 %)	1.34 %
<b>Biotina</b>	500X (0.02%)	$4 \cdot 10^{-5}$ %
<b>Glicerol</b>	10X (10%)	1 %

Según lo señalado en el manual “EasySelect *Pichia* expression kit (Version G)” (Invitrogen).

El medio YNB (Yeast nitrogen base with ammonium sulfate without amino acids) y la biotina se esterilizaron por filtración y los demás componentes en autoclave a 121°C por 15 minutos. Una vez esterilizados todos los componentes se mezclan en el orden descrito y en las cantidades necesarias para obtener el medio en la concentración indicada.

Se inocularon 200  $\mu$ L de las células de *Pichia pastoris* reactivadas por cada 50 mL de medio BMGY y se incubó a 30°C y 300 rpm de agitación orbital hasta alcanzar una D.O<sub>600</sub>  $\approx$ 2. Posteriormente se centrifugó el medio en tubos Falcon de 50 mL estériles a 4000 rpm, 10 minutos a 4 °C en una centrífuga Beckman J2-MC, rotor JA10. Se recuperaron las células y se desechó el sobrenadante.

### C. Expresión de la enzima

Se preparó 1 L de medio BMMY (Buffered Methanol-complex medium), cuya composición aparece en la tabla 6.

**Tabla 6.** Composición del medio BMMY.

Componente	Solución stock	Concentración
<b>Extracto de levadura</b>	-----	1 %
<b>Peptona</b>	-----	2 %
<b>Buffer de fosfatos de potasio, pH 6.0</b>	1 M	100 mM
<b>YNB</b>	10X (13.4 %)	1.34 %
<b>Biotina</b>	500X (0.02%)	$4 \cdot 10^{-5}$ %
<b>Metanol</b>	-----	1 %

Según lo señalado en el manual “EasySelect *Pichia* expression kit (Version G)” (Invitrogen).

El medio YNB (Yeast nitrogen base with ammonium sulfate without amino acids) y la biotina se esterilizan por filtración y los demás componentes en autoclave a 121°C por 15 minutos. Una vez esterilizados todos los componentes se mezclan en el orden descrito en las cantidades necesarias para obtener el medio en la concentración indicada.

Las células generadas en el medio BMGY se inoculan en matraces con 50 mL de medio BMMY, de tal modo que se logre por cada matraz una  $D.O_{600} \approx 1$ . Una vez obtenida dicha densidad se agrega como inductor de la enzima metanol al 100 % y se incuba a 30 °C y 300 rpm de agitación orbital. A las 24 horas se vuelve a adicionar metanol y se deja en incubación otras 24 horas.

#### *D. Verificación de actividad de esterasa*

Para corroborar la producción de la enzima de manera cualitativa, se tomaron 70 µL del extracto enzimático y se adicionó un volumen igual de una solución de  $\alpha$ -Naftil acetato (Solución A), se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, como reactivo revelador se utilizaron 70 µL de una solución de Fast Red TR (Solución B).

Solución A: Se pesaron 0.4 mg de  $\alpha$ -Naftil acetato, se disolvieron en 200  $\mu$ L de acetona y se llevó a un volumen de 2 mL con buffer de fosfatos 50 mM pH 7.5.

Solución B: Se pesaron 2 mg de Fast Red TR, se adicionaron 2  $\mu$ L de Tritón X-100 y se llevó a un volumen final de 2 mL con buffer de fosfatos 50 mM pH 7.5.

#### *E. Concentración del extracto enzimático*

Una vez verificada la expresión de la enzima, las células se separaron por centrifugación a 4000 rpm durante 10 min a 4 °C. El pellet se desechó y el sobrenadante se recuperó para ser concentrado por ultrafiltración en una celda con agitación (Amicon), utilizando una membrana YM con límite de exclusión de 10 kDa. El proceso se realizó conteniendo la muestra en un baño de hielo y a una presión de 40 psi. El concentrado obtenido se ultrafiltró nuevamente con un volumen igual de buffer de fosfatos 50 mM pH 7.5 para acondicionar a la enzima a este pH.

#### *F. Caracterización del extracto enzimático concentrado a pH 7.5*

Al extracto obtenido se le realizaron las siguientes determinaciones:

##### 1. Cuantificación de actividad de esterasa

El método empleado fue el descrito por Ejima et al. (2004) el cual usa como sustrato *p*-Nitrofenil acetato. Se tomaron 50  $\mu$ L del extracto enzimático y se adicionaron 850  $\mu$ L de buffer de fosfatos de potasio pH 7.2, 50 mM con 0.1 % de desoxicolato de sodio y se agregaron 100  $\mu$ L de *p*-Nitrofenil acetato 20 mM preparado en metanol. Se siguió la liberación del *p*-nitrofenol espectrofotométricamente (SPECTRONIC 21D) a 25°C tomando mediciones de la absorbancia a 405 nm cada minuto por 10 minutos. Las unidades de actividad enzimática fueron calculadas por la diferencia entre la pendiente de la regresión lineal obtenida y la pendiente de un blanco de autohidrólisis realizado previamente

en el que la enzima es reemplazada por agua. El coeficiente de extinción molar del *p*-nitrofenol bajo estas condiciones es de  $13\,400\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ .

## 2. Cuantificación de proteína

La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente a 595 nm por el método de Bradford empleando como reactivo azul de Coomasie (BioRad) y haciendo uso de una curva patrón.

## 3. Perfil de proteínas

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) usando un gel concentrador al 4% y un gel separador al 12 %. Como referencia se empleó un marcador de peso molecular que va de 10 a 200 kDa (Fermentas).

### 3.1 Tratamiento de la muestra

Se hicieron los cálculos para precipitar 50  $\mu\text{g}$  de proteína con ácido tricloroacético (TCA) al 100 %. La muestra se centrifugó a 14 000 rpm por 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó 2 veces con acetona centrifugando a las mismas condiciones entre cada lavado. Posteriormente la proteína se resuspendió en 5  $\mu\text{L}$  de buffer de carga SDS 4X con  $\beta$ -mercaptoetanol y se calentó a 95°C durante 5 minutos. Ya que la muestra se colocó en el gel, éste se corrió en una cámara de electroforesis (Miniprotean II, BioRad) a 80 Volts. Cuando la muestra llega al gel separador se cambia el voltaje a 120 Volts.

### 3.2 Tinción con plata

Para observar las bandas se utilizó el protocolo de tinción de máxima sensibilidad del Page Silver™ Staining kit (Fermentas).

#### 4. Zimograma

La actividad de esterasa se observó en un zimograma por medio de una electroforesis en condiciones nativas ocupando un gel concentrador de acrilamida al 4 % y un gel separador al 12 %. Se cargaron 17  $\mu\text{L}$  de la muestra con 8  $\mu\text{L}$  de buffer de carga nativo 4X. El gel se corrió a 80 Volts y una vez que las muestras llegaron al gel separador se cambió a 120 Volts. Finalizada la corrida el gel se lavó por 1 minuto con agua desionizada, se adicionaron 25 mL de solución con  $\alpha$ -Naftil acetato (solución A) y se incubó por 30 minutos a 37 °C. Finalmente se agregaron 25 mL de la solución reveladora de Fast Red TR (solución B). Las bandas de actividad presentan un color rojo intenso.

#### *G. Inmovilización*

La inmovilización de la enzima se llevó a cabo por el método de adsorción usando un soporte hidrofóbico de polipropileno (Accurel MP 1000) pretratado como se describe a continuación.

##### 1. Pretratamiento del soporte

Se pesaron 2 g del soporte y se colocó en etanol absoluto, solución que se retiró y se adicionó una nueva de etanol al 50%; esta última solución se cambió por agua desionizada y cada una de las etapas mencionadas duró 30 minutos. Finalmente el agua desionizada se retiró por filtración al vacío y el soporte se secó en la estufa estática a 37°C durante 2 horas.

##### 2. Proceso de adsorción

Las condiciones a las cuales se llevó a cabo la inmovilización fueron las establecidas previamente dentro del grupo de trabajo, pero modificando el tiempo y la agitación (48 h en vez de 24 y 200 rpm en lugar de 150) (Tabla 7). El soporte

pretratado se colocó en viales para ponerse en contacto con el extracto enzimático y la agitación se llevó a cabo en una placa con agitación orbital (Lab-Line 3518 Instruments Inc.). Una vez concluido el tiempo indicado se filtró al vacío y el soporte con la enzima inmovilizada se lavó con 6 mL de buffer de fosfatos 50 mM pH 7.5. El biocatalizador obtenido se secó en desecador por 2 horas a 4°C y posteriormente se almacenó en refrigeración.

**Tabla 7.** Condiciones inmovilización.

Relación proteína- soporte	0.002 mg prot/mg soporte
Temperatura	4°C
Agitación	200 rpm
Tiempo	48 h

#### *H. Caracterización de la proteína no adherida*

Al finalizar el proceso de inmovilización el sobrenadante se colectó y se le determinó, actividad de esterasa con  $\alpha$ -NA y *p*-NPA según la metodología ya indicada y se cuantificó proteína por el método de Bradford.

#### *I. Evaluación de la actividad de la enzima inmovilizada con diferentes solventes*

Los solventes utilizados fueron hexano, éter diisopropílico, *tert*-butanol y acetona; los cuales presentan diferente valor de log *P*. El ensayo se hizo usando 1 mL de solvente y 10 mg de la enzima inmovilizada, posteriormente se incubó durante 72 h a 25, 37 y 50°C.

La actividad de esterasa remanente en el biocatalizador se cuantificó espectrofotométricamente a 405 nm usando como sustrato *p*-NPA 20 mM preparado en metanol.

### *J. Reacción de biocatálisis*

Como sustrato para la transesterificación enzimática se utilizó la mezcla racémica de 1-Feniletanol, el cual fue sintetizado previamente por reducción de acetofenona de acuerdo a lo indicado por Navarro-Ocaña (comunicación personal).

#### 1. Síntesis química del sustrato

Se pesaron 17 g de acetofenona y se disolvieron en 85 mL de metanol, después se adicionaron por porciones y lentamente 19 g de borohidruro de sodio. La mezcla fue calentada en baño María a 70°C durante 2 minutos, transcurrido este tiempo se dejó enfriar, se añadió agua de hielo lentamente y se filtró por gravedad. Al filtrado obtenido se le agregó un volumen igual de acetato de etilo y se extrajo la fase orgánica dos veces. Dicha fase se secó con sulfato de sodio anhidro para después ser filtrada. El producto de la reacción se concentró por destilación en rotavapor.

#### 2. Caracterización del sustrato

##### 2.1 Cromatografía en capa fina (CCF)

Se utilizaron placas de sílica gel G/UV<sub>254</sub> X 20 cm y 0.2 mm de espesor. El eluyente empleado fue una mezcla de hexano/acetato de etilo (8:2). Los componentes en la placa fueron observados mediante el revelado con una solución de sulfato cérico aplicada por aspersion y posterior calentamiento en parrilla.

##### 2.2 Resonancia magnética nuclear (RMN)

La muestra fue llevada a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química para un análisis espectroscópico de RMN – <sup>1</sup>H.



### 2.3 Cromatografía de gases (CG)

El análisis se llevó a cabo en un equipo cromatográfico equipado con un detector de ionización de flama (FID) y con una columna quiral capilar Chiraldex B-DM con dimensiones 30 m x 0.25 mm x 0.12  $\mu\text{m}$  (Supelco). Como gas acarreador se usó hidrógeno. La temperatura de la columna se mantuvo a 50°C por 10 minutos y posteriormente se incrementó 7.5°C/min hasta alcanzar 130 °C y se retuvo en esta temperatura por 10 minutos, finalmente la temperatura descendió 5°C/min hasta llegar a 55°C. Se utilizó el programa Peak 56 para la obtención de los cromatogramas.

### 3. Síntesis química del estándar del acetato

A fin de contar con un estándar para evaluar la reacción biocatalítica por CCF, se sintetizó la mezcla racémica de 1-Fenilacetato, según lo descrito por Navarro-Ocaña (comunicación personal).

El 1-Feniletanol obtenido previamente fue ocupado como reactivo para la síntesis del estándar. Por cada mol de 1-Feniletanol se usaron 2 moles de anhídrido acético y 4 moles de piridina. Una vez mezclados los componentes, la reacción se realizó en un baño María por un periodo de 10 horas cuidando que la temperatura se encontrara entre 60 y 70°C. Al concluir este tiempo se agregó en frío un volumen igual de HCl al 5 % y una vez verificado que el pH estuviera neutro se adicionó un volumen igual de cloruro de metileno. Se realizaron dos extracciones, se lavó la mezcla tres veces con agua fría, se secó con sulfato de sodio anhidro y finalmente se filtró por gravedad.

Para verificar la pureza del producto y que la reacción se completó se corrió y reveló una placa de CCF bajo las condiciones descritas anteriormente.

#### 4. Síntesis enzimática

##### 4.1 Deshidratación del solvente antes de la resolución cinética.

Se pusieron en contacto hexano y por otro lado éter diisopropílico con malla molecular de 4 Å en una concentración del 10% (w/v), de tal modo que se obtuvieron tres distintas muestras de hexano con  $a_w$  de 0.148, 0.146 y 0.066 respectivamente. El éter diisopropílico únicamente fue ajustado a un solo valor de  $a_w$  (0.066), dicho parámetro se midió en el equipo Rotronic,  $a_w$  Quick.

##### 4.2 Resolución del (R, S)-1-Feniletanol

Se disolvieron en 3 mL de solvente deshidratado la mezcla racémica del 1-feniletanol sintetizado previamente, como donador de acilo se utilizó vinil acetato en una concentración equimolar de 200 mM y se adicionaron 40 mg ( $\approx 51.2$  U) de la enzima inmovilizada. Las reacciones también fueron puestas con 15 mg ( $\approx 494.2$  U) de la enzima comercial Novozym 435 (Lipasa B de *Candida antarctica*). Todas se realizaron a 37°C y 200 rpm en una incubadora New Brunswick Scientific con agitación orbital. La tabla 8 indica las condiciones en las que se llevaron a cabo las reacciones.

**Tabla 8.** Condiciones a las que se corrieron las reacciones de resolución del (R, S)-1-Feniletanol tanto con la esterasa Stcl como con Novozym 435.

Solvente	Condición	$a_w$ del solvente al comienzo de la reacción	Tiempo de reacción (h)	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)
Hexano	1	0.148	72	37	200
	2	0.146	96	37	200
	3	0.066	120	37	200
Éter diisopropílico	4	0.066	120	37	200

Por otro lado se preparó un blanco de reacción con hexano y uno con éter diisopropílico a las mismas condiciones.

## 5. Evaluación de las reacciones

### 5.1 CCF

Al concluir los tiempos establecidos las reacciones se evaluaron por CCF como se describió con anterioridad. Como estándares se utilizaron el 1-Fenilacetato y el 1-Feniletanol sintetizados previamente.

### 5.2 CG

La enzima inmovilizada fue separada del medio de reacción por filtración (Filtro Supelco Analytical de 2  $\mu\text{m}$ ), se tomaron 60  $\mu\text{L}$  de muestra y se llevaron con hexano o éter diisopropílico, según fue el caso, a un volumen final de 1960  $\mu\text{L}$ .

Las muestras se analizaron bajo las condiciones mencionadas anteriormente y los blancos de las reacciones fueron tratados del mismo modo e inyectados para su análisis.

## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

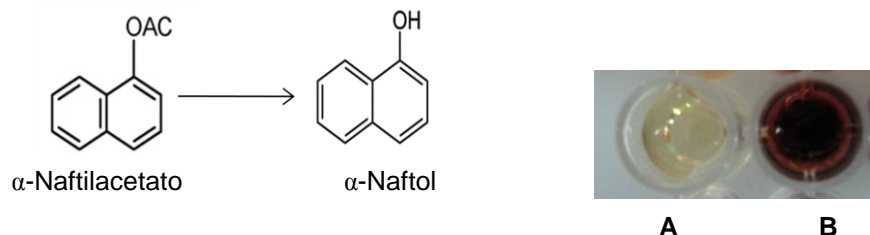
### A. Expresión de la enzima

Se utilizó a la levadura *Pichia pastoris* como sistema de expresión de la esterasa StcI recombinante. Las células reactivadas se inocularon en medio BMGY con la finalidad de generar biomasa y la fermentación se detuvo cuando se alcanzó una  $D.O_{600} \approx 2$  (Tabla 9). Posteriormente se indujo la expresión de la enzima en medio BMMY, en el cual el metanol actúa como inductor. Se verifica que la  $D.O_{600} \approx 1$ .

**Tabla 9.** Muestra los valores de densidad óptica alcanzada a dos distintos tiempos de fermentación en medio BMGY.

T (h)	D.O a 600 nm
22	1.572±0.056
26	1.904±0.043

Después de 48 horas de fermentación en el medio BMMY se verificó la expresión de la enzima por medio de la hidrólisis del  $\alpha$ -NA, pues con el reactivo Fast Red se revela el  $\alpha$ -Naftol liberado y un color rojo indica una reacción positiva. La figura 19 muestra que el extracto enzimático genera una coloración roja intensa lo que indica la presencia de la enzima, por lo tanto se procedió a la eliminación de las células y a la concentración del extracto por ultrafiltración (12.6 veces).

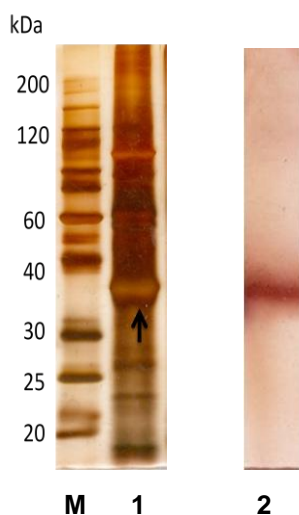


**Figura 19.** Actividad de esterasa a las 48 horas de fermentación en medio BMMY (A) Blanco: buffer de fosfatos pH 7.5 50 mM, (B) Extracto enzimático.

*B. Verificación de la presencia de la enzima por gel SDS-PAGE y zimograma.*

Una vez concentrado el extracto enzimático por ultrafiltración, se procedió a la separación de las proteínas por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS con el objetivo de identificar a la esterasa StcI de acuerdo a su peso molecular. La figura 20 señala la presencia de una banda en un peso molecular aproximado de 35 kDa, valor que coincide con el esperado según lo reportado por Peña- Montes et al. (2009). Además se observa que esta proteína presenta la banda con mayor intensidad, lo que indica que durante la fermentación la StcI es la que se produce en mayor cantidad con respecto a las demás proteínas del extracto.

Con la finalidad de corroborar que la enzima StcI continuara siendo la única enzima con actividad de esterasa dentro del extracto, se realizó un zimograma en un gel nativo. Lo que se observa es una sola banda con el color rojo característico en un peso cercano a los 35 kDa (Figura 20). De acuerdo a lo realizado previamente por el grupo de trabajo se sabe que la cepa silvestre de *Pichia pastoris* no produce ninguna enzima con actividad de esterasa (Peña-Montes et al, 2009), por lo tanto la StcI sigue siendo la única proteína en el extracto crudo que presenta dicha actividad.

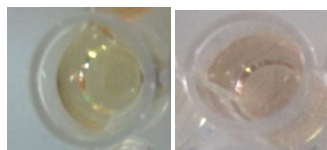


**Figura 20.** Perfil de proteínas y zimograma al extracto enzimático. M) Marcador de peso molecular, 1) SDS-PAGE teñido con plata, 2). Zimograma en gel nativo teñido con  $\alpha$ -NA.

### C. Inmovilización

Debido a la presencia de dominios hidrofóbicos, lipasas y estererasas son usualmente inmovilizadas por adsorción a soportes hidrofóbicos. Por tal motivo la esterasa StcI fue inmovilizada sobre una matriz de polipropileno (Accurel MP1000). Las lipasas de *Rhizopus arrhizus*, *Pseudomas fluorescense*, *Aspergillus niger*, *Penicillium roquefortii*, *Candida rugosa* o *Humicola lanuginosa* ya han sido inmovilizadas en soportes de polipropileno (Gitlesen et al, 1997).

El proceso se realizó tomando 2 mL del extracto enzimático, los cuales presentaban una actividad de 328.05 U/ mL y usando 300 mg de Accurel. Al concluir las 48 horas de inmovilización se hizo un ensayo con  $\alpha$ -NA al sobrenadante, es decir, a la proteína que no se adhirió al soporte. En la figura 21 se observa una tenue coloración roja en dicho sobrenadante, lo que indica una baja actividad de esterasa y por lo tanto sugiere que la mayor parte de la enzima se ha adsorbido al soporte.



A B

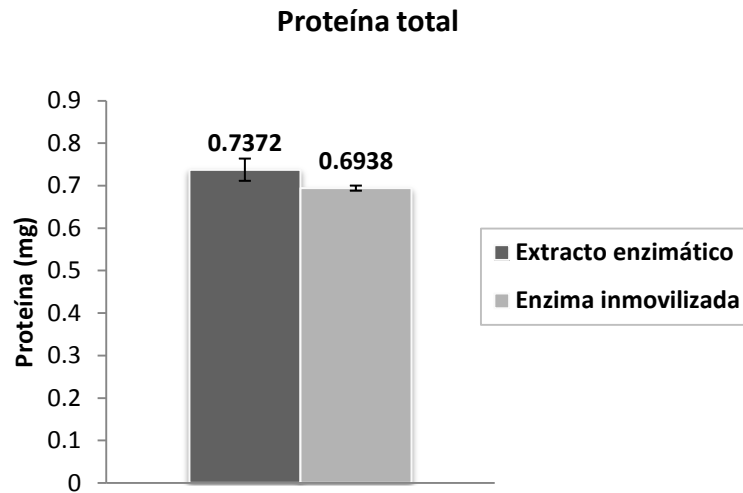
**Figura 21.** Actividad de esterasa después de la inmovilización (A) Blanco: buffer de fosfatos pH 7.5 50 mM, (B) Proteína no adherida al soporte.

Para evaluar el proceso de inmovilización, se cuantificó proteína por el método de Bradford tanto al extracto crudo como al sobrenadante, la diferencia entre estas soluciones indica la cantidad de proteína adsorbida al soporte. Se midió actividad enzimática al extracto crudo en donde se obtiene una actividad específica de 890.002 U/mg de proteína, dicho resultado contrasta con el obtenido con anterioridad por Peña-Montes et al, 2009, en el que la actividad específica fue de 360 U/mg de proteína, lo cual pudo deberse a que la cepa produjo una menor cantidad de proteína (0.3686 mg/mL) que lo ya reportado (0.527 mg/mL), sin embargo presentó mayor actividad volumétrica (328.5 U/mL contra 189.7 U/mL). También se le determinó actividad al sobrenadante y al inmovilizado con *p*-Nitrofenil acetato a 405 nm. Los resultados mostrados en la tabla 10 indican que a pesar de que se adsorbió la mayoría de la proteína del extracto enzimático crudo (94.11%), la actividad específica disminuyó 1.6 veces. Las figuras 22 y 23 ilustran tales resultados. Previamente en nuestro grupo de trabajo ya se había reportado una disminución de la actividad al inmovilizar a la esterasa StcI. Es posible que la inmovilización haya originado un cambio conformacional de la proteína que haya dado lugar a formas inactivas o que la unión al soporte se haya producido de tal modo que el acceso del sustrato al sitio activo se encuentre limitado (Arroyo, 1998) y por lo tanto la actividad catalítica se vea afectada negativamente. Al final se logró obtener un biocatalizador con una actividad enzimática de  $1.28 \pm 0.20$  U por cada mg de soporte, en contraste con el trabajo previo en el que se generó un inmovilizado con 0.5256 U por mg de soporte, esta diferencia puede deberse a que el proceso fue llevado durante 48 horas en vez de 24 y a una agitación de 200

rpm en lugar de 150, tales cambios pudieron haber favorecido el contacto de la enzima con el soporte.

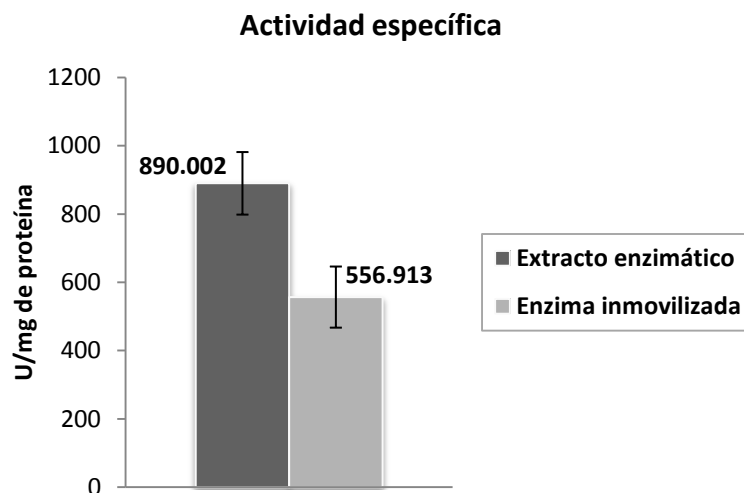
**Tabla 10.** Rendimientos de actividad y proteína del proceso de inmovilización.

	<b>Proteína (mg)</b>	<b>Actividad volumétrica (U/mL)</b>	<b>Actividad específica (U/mg prot)</b>
<b>Extracto enzimático</b>	0.7372	328.05	890.002
<b>Sobrenadante</b>	0.0434	61.33	
<b>Biocatalizador</b>	0.6938		556.91
<b>Rendimiento (%)</b>	94.11		62.57



**Figura 22.** Comparación del contenido de proteína entre el extracto enzimático crudo y el biocatalizador.





**Figura 23.** Comparación de la actividad específica entre el extracto enzimático crudo y el biocatalizador inmovilizado a una concentración de proteína de 0.3686 mg/mL, 300 mg de soporte, 4°C, 200 rpm, 48 horas.

Una de las ventajas de la inmovilización sobre soportes hidrofóbicos es que en algunos casos ocurre la hiperactivación de la enzima. Volcan-Almeida et al, (2008) inmovilizaron a la esterasa recombinante *Pf2001* de *Pyrococcus furiosus* sobre Accurel MP 1000 en donde obtienen resultados que van del 106 al 337% de actividad catalítica después de inmovilizar y además reportan que dicha actividad está en función de la relación proteína soporte durante el proceso de inmovilización.

Por el contrario, al igual que con la esterasa Stcl, al inmovilizar la esterasa recombinante de *Lactobacillus plantarum* sobre Accurel MP 1000, no se observa el fenómeno de hiperactivación, con esta última se retuvo el 83% de la actividad inicial (Kolling et al, 2010).

Por lo tanto, la actividad catalítica residual al final de la inmovilización dependerá de varios factores por ejemplo; del área de superficie disponible en la matriz, la

cantidad de proteína adsorbida, de la naturaleza del soporte, relación proteína soporte o cambios estructurales de la enzima.

*D. Determinación de actividad del biocatalizador frente a distintos solventes y temperaturas.*

Si la estructura de la enzima se afecta por la naturaleza del medio de reacción, es lógico pensar que al reemplazar el agua por un solvente orgánico habrá alteraciones en la actividad de la enzima.

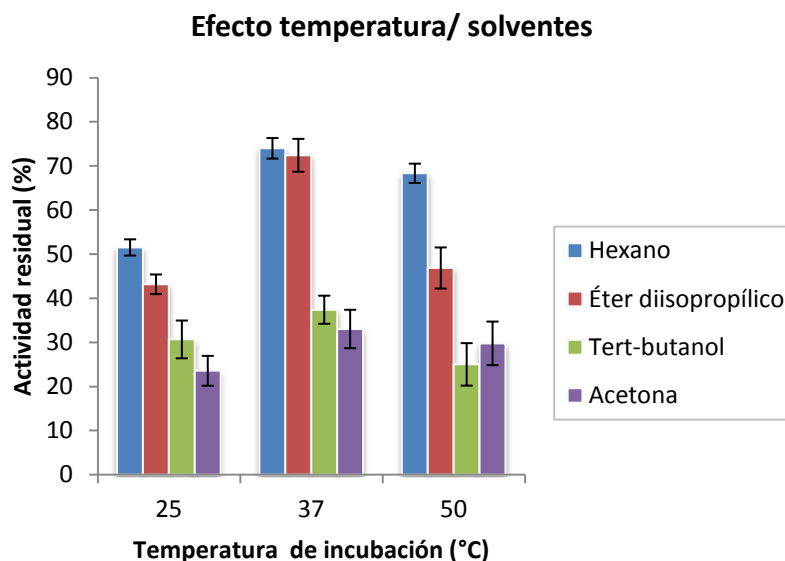
Se sabe que las enzimas pueden ser termoestables en solventes orgánicos debido a la conformación rígida que adquieren en el estado deshidratado (Klibanov, 2001). La naturaleza de cada solvente repercute de manera importante en la actividad enzimática, por lo tanto uno de los factores a considerar en una reacción con enzimas en un medio orgánico es la polaridad del solvente. Por esta razón, para evaluar la actividad del biocatalizador inmovilizado se eligieron solventes que presentaran distintos valores de  $\log P$  (Tabla 11), el cual es el parámetro que mejor define la polaridad de un solvente.

El ensayo se realizó cuantificando la actividad residual con *p*-nitrofenil acetato a 405 nm después de 72 horas de incubación a diferentes temperaturas (25, 37 y 50°C), con cada uno de los solventes.

**Tabla 11.** Valores de  $\log P$  de los solventes utilizados.

<b>Solvente</b>	<b>Log <i>P</i></b>
<b>Hexano</b>	3.5
<b>Éter diisopropílico</b>	1.9
<b><i>Tert</i>-butanol</b>	0.8
<b>Acetona</b>	-0.23

Los resultados indican que la polaridad del solvente está muy relacionada con la estabilidad de la proteína, ya que la actividad residual es menor conforme aumenta la polaridad del solvente (menor valor de  $\log P$ ).



**Figura 24.** Efecto de la temperatura y los solventes sobre la actividad remanente de la enzima inmovilizada a una concentración de 10 mg de biocatalizador por mL de solvente durante 72 horas.

Las enzimas presentan una monocapa de agua que les permite mantener su estructura nativa, cuando un solvente es hidrofílico puede ser capaz de modificar la estructura de la enzima ya que presentará cierta afinidad por el agua presente en la superficie de la proteína y podrá retirar la monocapa de agua que se requiere para mantener la flexibilidad de la enzima, la cual es fundamental para su actividad catalítica (Suan et al, 2004). La acetona, al ser el solvente más polar, puede retirar una mayor cantidad de agua presente en la enzima, a diferencia del hexano, que al ser más hidrofóbico interactuará con el agua en menor grado.

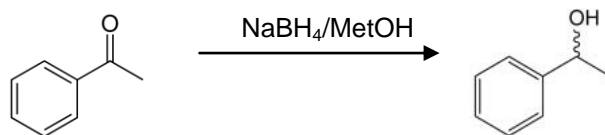
De acuerdo a este ensayo, la temperatura que afecta en menor medida la conformación de la enzima, y por lo tanto la que le permite retener la mayor

actividad, es 37°C. La figura 24 indica que el biocatalizador conservó más actividad en hexano a 37°C en donde retuvo el 74% de su actividad inicial. Es probable que a esta temperatura se haya favorecido, en mayor grado que a la de 25 °C, las interacciones intramoleculares como puentes de hidrógeno, y que tales hayan originado una conformación distinta de la proteína siendo la más adecuada para el acceso del sustrato al sitio activo la que se generó a los 37 y no a los 25°C lo cual se ve reflejado en el aumento de la actividad. Sin embargo, cuando la enzima inmovilizada es sometida a 50°C la actividad disminuye un 6%. La actividad enzimática es menor cuando la enzima fue incubada a 50°C que la que se obtuvo cuando se incubó a 37°C, y el caso más notable ocurre cuando el solvente empleado es el éter diisopropílico. El descenso de la actividad es explicable a altas temperaturas, puesto que puede ocurrir una desnaturalización parcial de la enzima. Sin embargo, el papel del solvente en la dinámica de la proteína es importante, porque como se ve, el efecto difiere de solvente a solvente. Cuando se utilizan *ter*-butanol y acetona no existe una notable diferencia entre cada una de las temperaturas evaluadas. Por lo tanto, puede decirse que la estabilidad enzimática es el resultado de una combinación de factores, tanto la temperatura como el solvente ejercen un efecto sobre la flexibilidad de la enzima, lo cual repercute en la estabilidad del biocatalizador, y que afectará la actividad detectada en el ensayo.

## E. REACCIÓN DE BIOCATÁLISIS

### 1. Síntesis química del sustrato

El sustrato de la enzima en la reacción de transesterificación fue la mezcla racémica del 1-feniletanol. Dicho compuesto se sintetizó químicamente, a partir de acetofenona y borohidruro de sodio, reacción que se muestra en la figura 25.



**Figura 25.** Síntesis del (*R/S*)-1-Feniletanol por reducción de acetofenona.

## 2. Caracterización del (*R/S*)-1-Feniletanol

### 2.1 Cromatografía en capa fina

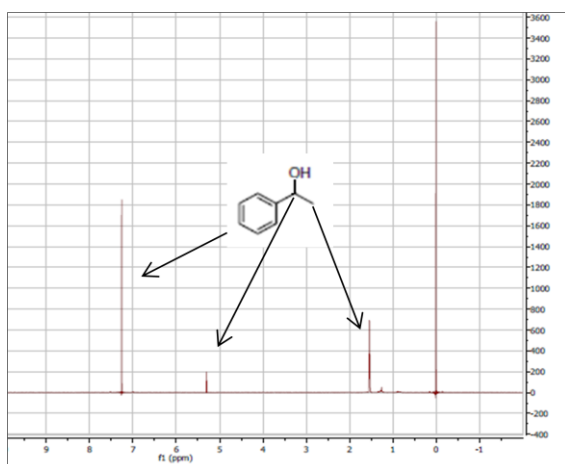
Con el objetivo de saber si la reacción se completó y de evaluar la pureza del sustrato, se hizo una cromatografía en capa fina. En esta es posible diferenciar al reactivo (acetofenona) del producto (1-Feniletanol), que por diferencia en sus polaridades avanzaron de manera distinta en la placa. El eluyente que se empleó fue una mezcla de hexano y acetato de etilo (8:2). Después de revelar con sulfato cérico, se observa una sola mancha en el carril correspondiente al producto, por lo tanto la reacción fue llevada a cabo completamente (Figura 26).



**Figura 26.** CCF al finalizar la síntesis del sustrato. A) Acetofenona ( $R_f=0.65$ ), B) 1-Fenietanol ( $R_f=0.43$ ).

## 2.2 Resonancia magnética nuclear

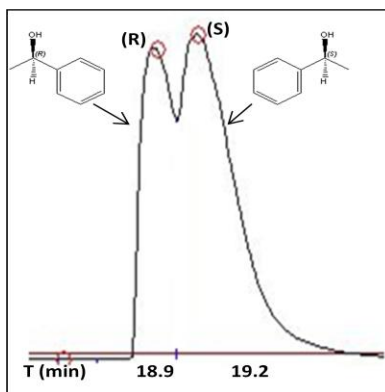
El siguiente análisis que se hizo fue corroborar la estructura del sustrato por medio de RMN. Como lo señala el espectro (Figura 27), la estructura coincide con la esperada, además no se perciben señales de ruido lo que indica que el compuesto es el indicado para ocuparse como sustrato en la reacción de síntesis enzimática.



**Figura 27.** Espectro de RMN –  $^1\text{H}$  del 1-Feniletanol.

## 2.3 Cromatografía de gases

El sustrato fue analizado por cromatografía de gases, utilizando como fase estacionaria una columna quiral, con este estudio es posible observar si la mezcla contenía alguna impureza de carácter quiral y por otro lado sirve para conocer los tiempos de retención de cada enantiómero (Figura 28), dichos tiempos fueron para el (S)-1-Feniletanol; 19.2 minutos y, para el (R)-1-Feniletanol 18.9 minutos.



**Figura 28.** Separación enantiomérica del (R/S)-1-Feniletanol con columna quiral.

### 3. Control del $a_w$ del solvente previo a la resolución cinética.

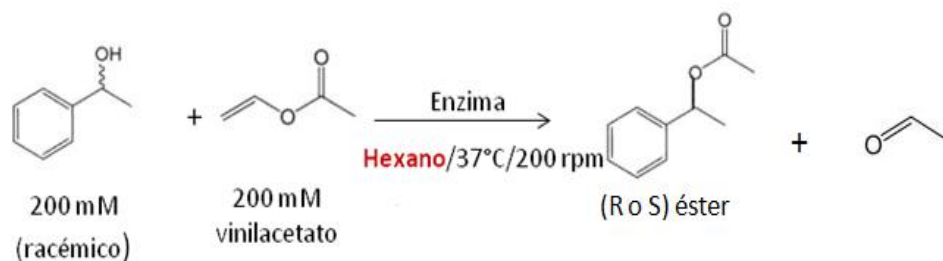
Las resoluciones cinéticas usando enzimas como biocatalizadores para la obtención de compuestos enantiopuros han ganado gran interés en la industria. Las lipasas de *Pseudomas cepacia*, *Candida antarctica* y *Candida rugosa* han sido ampliamente utilizadas para la resolución de alcoholes secundarios (Suan et al, 2004).

En una reacción de síntesis, la cantidad de agua presente en el medio juega un papel fundamental, ya que se encuentra relacionada con la actividad que presentará la enzima. Por otro lado el agua puede competir como nucleófilo de la reacción y desplazar el equilibrio hacia reactivos en vez de hacia productos. Sin embargo es importante conservar la cantidad mínima necesaria que le permita a la enzima retener su actividad catalítica.

Con la finalidad de evaluar la influencia del agua en el medio, previo a poner las reacciones, el solvente (hexano) fue deshidratado con malla molecular para obtenerse tres distintas muestras con los siguientes valores de  $a_w$ : 0.148, 0.146 y 0.066.

#### 4. Resolución cinética

Como donador del grupo acilo se utilizó vinil acetato, el cual es de los más empleados ya que el vinil alcohol formado como subproducto de la reacción sufre una tautomerización ceto-nol para producir el correspondiente compuesto carbonílico (acetaldehído), este no puede actuar como sustrato de la enzima y por lo tanto hace a la reacción irreversible (Habulin et al, 2009). Como nucleófilo se utilizó el (R, S)-1-Feniletanol sintetizado previamente y se adicionaron 40 mg del biocatalizador inmovilizado ( $\approx 51.2$  U). También se corrieron las reacciones con la enzima comercial Novozym 435 (Lipasa B de *Candida antarctica*), pero de esta enzima sólo se utilizaron 15 mg ( $\approx 494.25$  U). Tomando como base los resultados obtenidos en las pruebas de actividad con distintos solventes, se decidió que la reacción de síntesis sería en hexano a  $37^{\circ}\text{C}$ , ya que es en estas condiciones en donde la enzima Stcl inmovilizada retuvo la mayor actividad. La figura 29 muestra la reacción que describe la síntesis del 1-Fenilacetato y la tabla 12 indica las condiciones a las que se corrieron las reacciones.



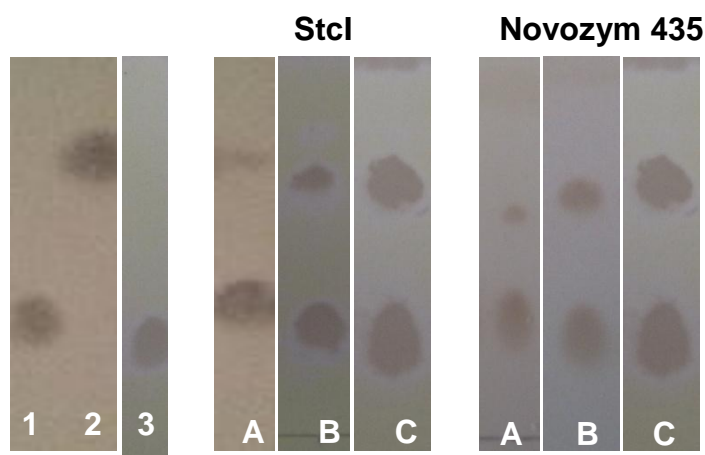
**Figura 29.** Reacción de síntesis de 1-Fenilaceto en hexano.



**Tabla 12.** Condiciones a las que se corrieron las reacciones de resolución del (*R*, *S*)-1-Feniletanol en hexano tanto con la esterasa StcI como con Novozym 435.

Solvente	Condición	$a_w$ del solvente al comienzo de la reacción	Tiempo de reacción (h)	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)
Hexano	1	0.148	72	37	200
	2	0.146	96	37	200
	3	0.066	120	37	200

Para monitorear la reacción se realizó CCF, las placas se corrieron en un sistema de hexano y acetato de etilo (8:2), las placas fueron reveladas con sulfato cérico. La figura 30 muestra que ambas enzimas catalizaron la reacción a las tres condiciones.

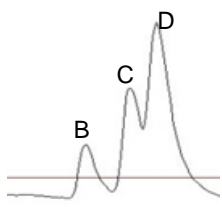
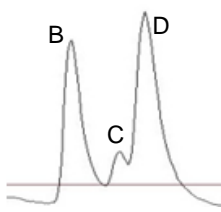
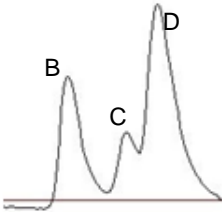
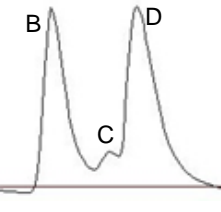
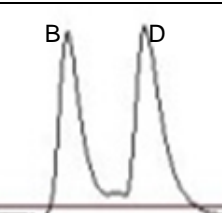
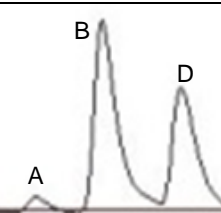


**Figura 30.** Evaluación de la reacción de síntesis del 1-Fenilacetato por CCF. 1) Estándar de 1-Feniletanol, 2) Estándar de 1-Fenilacetato, 3) Blanco (reacción sin enzima), A) Producto de la reacción en condición 1, B) Producto de la reacción en condición 2, C) Producto de la reacción en condición 3.

## 5. Separación enantiomérica con columna quiral

Al concluir los tiempos de incubación establecidos la enzima inmovilizada se removió del medio de reacción por filtración. Con el objetivo de determinar la enantioselectividad, el exceso enantiomérico y el grado de conversión, se hizo un análisis de las reacciones por cromatografía de gases haciendo uso de una columna quiral como fase estacionaria.

**Tabla 13.** Separación enantiomérica con columna quiral. A) S-1-Fenilacetato, B) R-1-Fenilacetato, C) R-1-Feniletanol, D) S-1-Feniletanol.

Condición	$a_w$ al tiempo cero de reacción	Tiempo de reacción (h)	Temp. (°C)/Agitación (rpm)	StcI	Novozym 435
1	0.148	72	37/200		
2	0.146	96	37/200		
3	0.066	120	37/200		

La tabla 13 muestra los cromatogramas correspondientes a cada una de las condiciones a la cuales fueron puestas las reacciones. En ellos se identifica que ambas enzimas son enantioselectivas para el isómero (R). En los tres casos y para las dos enzimas se observa el consumo del (R)-1-Feniletanol (pico C) y un

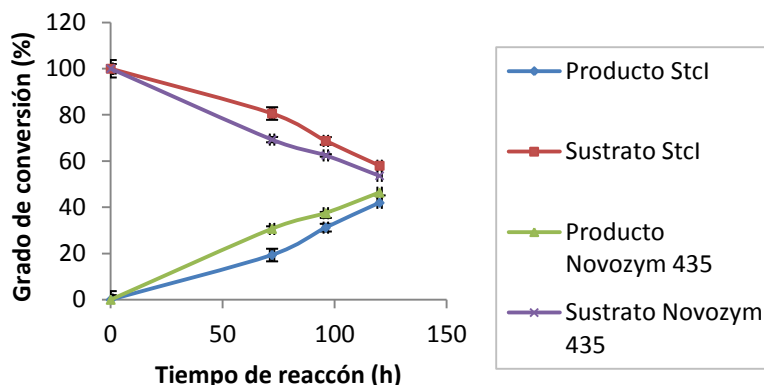
aumento en el área del pico B, lo que corresponde a la aparición del (R)-1-Fenilacetato. En el caso de la enzima comercial, al último tiempo de reacción se observa la aparición del pico que indica la presencia del (S)-1-Fenilacetato (pico A), lo cual sugiere que la enzima Novozym 435 también es capaz de catalizar la reacción con el isómero (S) pero a menor velocidad y una vez que ha consumido completamente al isómero (R). Los enantiómeros de un sustrato quiral tienen la capacidad de orientarse de un modo distinto al sitio activo de la enzima, por lo tanto los resultados proponen que el enantiómero (S) puede estar presentando impedimentos estéricos que dificulten la formación del estado de transición hacia la formación de productos. Suan et al (2004) menciona que el isómero (S), al no orientarse de la manera adecuada en el centro activo de la enzima, no puede formar el puente hidrógeno entre el oxígeno del alcohol y la histidina catalítica el cual es esencial para la actividad enzimática. Los tiempos de retención fueron para el (S)-1-Fenilacetato, (R)-1-Fenilacetato, (R)-1-Feniletanol y (S)-Feniletanol de 18.2, 18.7, 18.9 y 19.2 min, respectivamente.

Al ser una resolución cinética la máxima conversión que se puede alcanzar es de un 50% (Ghanem et al, 2004). En la figura 31 se encuentran los grados de conversión para cada tiempo de reacción, el cual fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} * 100$$

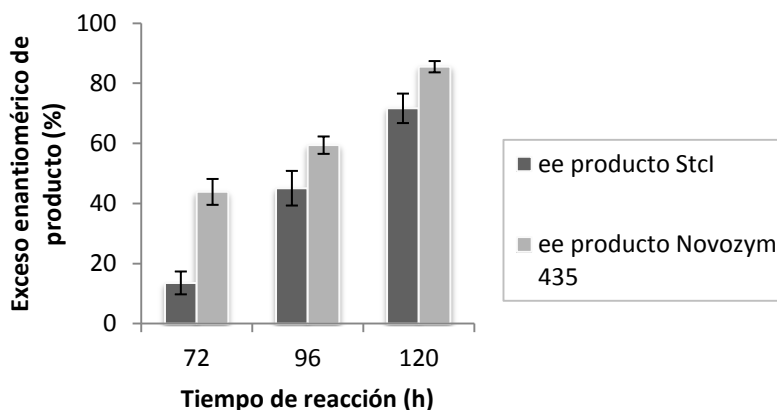
Donde  $ee_s$  es el exceso enantiomérico del sustrato y  $ee_p$  el exceso enantiomérico del producto.

La figura 31 indica que cuando la reacción dura 120 horas es alcanzada la mayor conversión, la StcI produce el 41.97 % y Novozym 435 produce el 46.35 % del (R)-1-Fenilacetato. Como se observa en la tabla 13, la enzima comercial a este tiempo de reacción ha comenzado a sintetizar el enantiómero (S) y por lo tanto la pureza enantiomérica del isómero deseado se puede ver afectada.



**Figura 31.** Grado de conversión de sustrato y de producto a los distintos tiempos de reacción para las dos enzimas estudiadas.

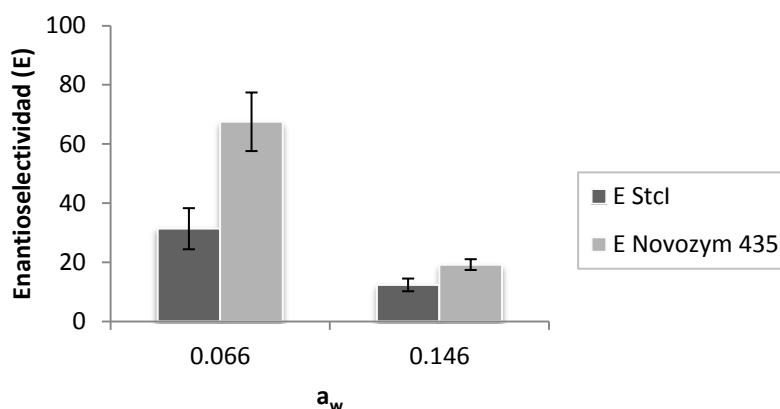
Una resolución cinética será exitosa en términos de la pureza enantiomérica del enantiómero deseado (alto  $ee_s$  o alto  $ee_p$ ) y del valor de la relación enantiomérica (E). Como lo indica la figura 32, el exceso enantiomérico del producto se incrementa conforme avanza el tiempo de reacción. La máxima pureza del producto se logra a las 120 h de reacción (71.69 % $ee_p$  para la StcI y 85.55 % $ee_p$  para Novozym 435).



**Figura 32.** Relación del exceso enantiomérico con el tiempo de reacción.

Otro parámetro estudiado fue la relación enantiomérica (E). Es sabido que la enantioselectividad de las enzimas depende de diversos parámetros como la temperatura, la estructura del sustrato, el medio de reacción y la actividad acuosa (Léonard et al, 2007). La manipulación de este último parámetro entre las

condiciones 2 y 3 permitió conocer el efecto que ejerce el contenido de agua en el medio sobre la enantioselectividad de la enzima. Con la figura 33 se aprecia que reduciendo el valor del  $a_w$  de 0.146 a 0.066, se presenta un aumento de la enantioselectividad de 2.54 veces para la esterasa Stcl y de 3.51 veces para Novozym 435, es decir, la diferencia entre las velocidades de reacción para cada enantiómero se hace más grande, siendo el isómero (R) el favorecido. Dichos resultados concuerdan con los reportados por Léonard et al. (2007) en donde se estudió la influencia de la actividad del agua sobre la enantioselectividad en la acilación del 2-pentanol con metil propanoato en una reacción catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica*. Sus resultados muestran que en el intervalo de  $a_w$  de 0 a 0.2 se obtuvieron los valores más altos de enantioselectividad (101 a 320), y con  $a_w$  más grandes la enantioselectividad disminuyó.



**Figura 33.** Relación de la enantioselectividad con el valor de  $a_w$  del solvente al inicio de la reacción.

El agua, además de actuar como humectante molecular para incrementar la actividad de la enzima, puede actuar como sustrato competitivo resultando en una disminución en la velocidad de la transesterificación. Léonard et al. (2007) observaron en sus estudios que valores de  $a_w$  de hasta 0.02, la actividad alcohólica en la reacción de síntesis aumenta ya que el agua facilita la actividad al estar actuando como lubricante de la enzima. Conforme el  $a_w$  aumenta el agua

comienza a actuar como nucleófilo competitivo contribuyendo a la actividad hidrolítica.

Mediante modelos moleculares en CALB, Léonard et al. (2007) observaron como las moléculas de agua del medio pueden unirse al sitio activo. El agua localizada ahí afecta a los dos sustratos enantioméricos de modo distinto, causando una inhibición enantioselectiva dependiente del  $a_w$ .

Sin embargo, existen reportes en donde se muestra que el  $a_w$  influye de manera diferente sobre la enantioselectividad de la enzima. Efecto contrario al de Léonard et al. (2007) fue observado por Jönson et al. (1999), en donde se presentó un aumento de la enantioselectividad de 2.6 a 4.6 cuando el  $a_w$  aumentó de 0.53 a 0.97 en una reacción catalizada por una alcohol deshidrogenasa de *Thermoanaerobium brockii* en la reducción de la 2-pentanona. Por otro lado existen estudios que señalan que el  $a_w$  no influye en el valor de E, como lo reportado por Persson et al. (2002), en donde no se observan cambios significativos en la enantioselectividad de la lipasa tipo B de *Candida antarctica* y en lipasas de *Candidia rugosa* y *Rhizopus oryzae* en la esterificación del ácido 2-fenilpropiónico con 1 -heptanol, tal reacción fue realizada a valores de  $a_w$  que van de 0.06 a 0.97. Todos estos resultados sugieren que no existen reglas generales para predecir el efecto que ejercerá el  $a_w$  del medio sobre la enantioselectividad de una enzima, el comportamiento de cada una podrá variar según la reacción y las condiciones a las que se lleva.

De acuerdo a los datos obtenidos, es posible decir que la tercera condición (120 h/  $a_w = 0.066$ ) es la que favorece en mayor grado a la reacción, a este valor de  $a_w$  el equilibrio de la reacción se favorece hacia la formación de productos, además de que la enzima mantiene una conformación que le permite continuar activa. La tabla 14 resume los resultados de los parámetros calculados.

**Tabla 14.** Resolución del (*R/S*)-1-Feniletanol catalizada por la esterasa StcI y la enzima comercial Novozym 435 en hexano.

Condición	$a_w$ al tiempo cero de reacción	Tiempo de reacción (h)	Enzima	%ee <sub>p</sub>	E	%C <sub>p</sub>
2	0.146	96	StcI	45.10±5.76	12.32±2.14	31.22±2.72
			Novozym 435	59.43±2.89	19.19±1.81	37.49±1.15
3	0.066	120	StcI	71.69±4.90	31.31±6.95	41.97±1.66
			Novozym 435	85.55±1.88	67.47±9.90	46.35±0.54

Diversos investigadores han estudiado la resolución del (*R/S*)-1-Feniletanol con vinil acetato empleando diversas enzimas y condiciones de reacción. La tabla 15 da algunos ejemplos.

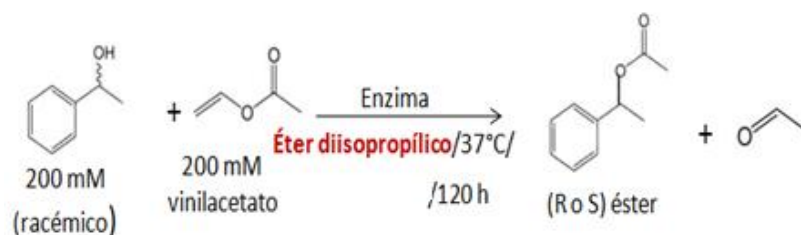
**Tabla 15.** Resultados de algunos autores acerca de la resolución enzimática del (*R/S*)-1-Feniletanol con vinil acetato.

Enzima	ee <sub>p</sub>	E	Solvente	Referencia
Lipasa B de <i>Candida antarctica</i> (CALB)	99	321	Carbonato de propileno	(Wu et al, 2008).
Lipasa de <i>Candida ruugosa</i> (CRL)	95	41	Carbonato de propileno	(Wu et al, 2008)
Lipasa porcina pancreática (PPL)	70	5	Carbonato de propileno	(Wu et al, 2008).
Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i>	99	>200	Tolueno	(Park et al, 2001).
Lipasa de <i>Burkholderia cepacia</i> (BCL)	99	>1000	Líquidos iónicos	(Shah et al, 2007).
Lipasa de <i>Candida ruugosa</i> (CRL)	99	453	Líquidos iónicos	(Shah et al, 2007).

Como se puede apreciar en la tabla 15, los resultados de una resolución cinética dependen de varios factores; como la enzima, el solvente y las condiciones de reacción. Por lo tanto, es importante la búsqueda de las condiciones ideales para cada enzima de manera particular, que permitan incrementar la enantioselectividad manipulando las condiciones de reacción.

## 6. Efecto del solvente

El solvente desempeña un papel fundamental en una reacción enzimática. Por tales motivos se decidió estudiar el efecto en la resolución del (*R/S*)-1-Feniletanol cambiando el solvente, para lo cual se llevó a cabo la reacción bajo las condiciones en las que se obtuvo el mayor grado de conversión y la mayor enantioselectividad, pero esta vez empleando éter diisopropílico en lugar de hexano (Figura 34). Se escogió dicho solvente, ya que en las pruebas de efecto de la temperatura y solventes sobre la actividad enzimática realizadas con anterioridad se observó que, después del hexano, el éter diisopropílico es el que le permite conservar la mayor actividad a la enzima inmovilizada.



**Figura 34.** Reacción de síntesis de 1-Fenilaceto en éter diisopropílico.

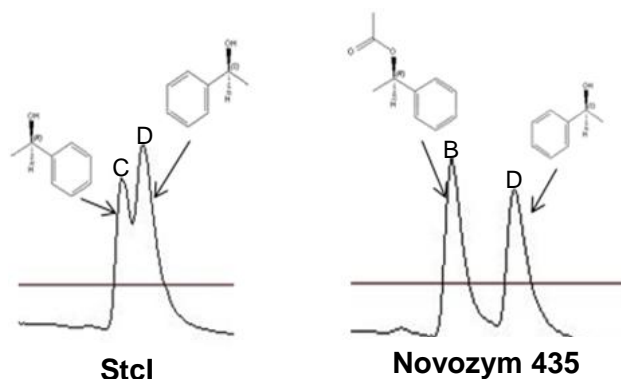
Conseguidas las 120 h de reacción se corrió una cromatoplaca con hexano y acetato de etilo (8:2) y se reveló con sulfato cérico. La figura 35 indica que la esterasa StcI no catalizó la reacción y que Novozym 435 si lo hizo.





**Figura 35.** Evaluación de la reacción de síntesis del 1-Fenilacetato en éter diisopropílico. A) Estándar de 1-Feniletanol, B) Estándar de 1-Fenilacetato, C) Producto de la reacción con la estersa StcI, D) Producto de la reacción con Novozym 435, E) Blanco (reacción sin enzima),

Después de separar la enzima por filtración se realizó el análisis por CG en el que se verificó que la enzima StcI no catalizó la reacción ya que no se observa ningún pico correspondiente a alguno de los enantiómeros del 1-Fenilacetato (Figura 36). La enzima Novozym 435 si catalizó la reacción siendo, del mismo modo que con hexano, selectiva para el isómero (R), sin embargo el exceso enantiomérico del producto y la conversión resultaron menores; además la enantioselectividad disminuyó 3.1 veces (Tabla 16).



**Figura 36.** Separación enantiomérica con columna quiral. B) R-1-Fenilacetato, C) R-1-Feniletanol, D) S-1-Feniletanol.

**Tabla 16.** Comparación de la resolución del (*R/S*)-1-Feniletanol por efecto del solvente, a las 120 horas de reacción y con un  $a_w$  inicial de 0.066.

Solvente	Enzima	%ee <sub>p</sub>	E	%C <sub>p</sub>
Hexano	Stcl	71.69±4.90	31.31±6.95	41.97±1.66
	Novozym 435	85.55±1.88	67.47±9.90	46.35±0.54
Éter diisopropílico	Stcl	0	0	0
	Novozym 435	62.44±1.99	21.27±1.55	38.67±0.75

Los resultados obtenidos coinciden con los conseguidos por Itoh et al. (2004). En su trabajo utilizan a la lipasa de *Pseudomonas cepacia* para catalizar la resolución del (*R/S*)-1-Feniletanol con vinil acetato. La enantioselectividad disminuyó de 16 a 10, y el exceso enantiomérico de producto se redujo de 85 a 73 al cambiar de hexano a éter diisopropílico.

Estos resultados reflejan la importancia del solvente en una reacción catalizada por enzimas, a pesar de que las condiciones fueron las mismas, el sólo hecho de cambiar el solvente afectó en gran medida los parámetros estudiados. Es sabido que la polaridad del solvente afecta la actividad y la enantioselectividad de la enzima (Suan et al, 2004). La desactivación de la Stcl pudo deberse al relativo bajo valor de log *P* del éter diisopropílico (1.9).

Como ya se ha mencionado las enzimas requieren cierta cantidad de agua en su superficie para mantener su conformación catalítica, y que tal cantidad depende de las propiedades del solvente. Es probable que la razón de la inactivación de la enzima en éter diisopropílico es a que este solvente, al ser más polar, tiene mayor tendencia que el hexano para disolver las moléculas de agua en la superficie de la enzima ocasionando algún cambio en la flexibilidad de la proteína. Si la flexibilidad disminuye, la enzima estará más impedida para acomodar el sustrato en el sitio catalítico y por lo tanto la actividad enzimática también disminuirá.

Por otro lado el solvente puede interferir con el acceso del sustrato al sitio activo, ya que se puede dar el caso de que algunas moléculas de solvente se unan al sitio catalítico y actúen como inhibidores competitivos. Graber et al. (2007) estudiaron los efectos de distintos solventes sobre la lipasa B de *Candida antarctica* mediante modelos moleculares. Encontraron que los solventes polares exhibieron mayor atracción sobre el sitio activo de la enzima que los solventes no polares. Con base en tales estudios se puede pensar que en comparación con el hexano, el éter diisopropílico tendrá mayor afinidad para unirse al sitio activo y actuará como inhibidor competitivo, lo cual se ve reflejado en una menor actividad catalítica.

## 10. CONCLUSIONES

- De acuerdo al zimograma realizado, la única enzima del extracto crudo con actividad de esterasa continúa siendo la Stcl.
- Durante el proceso de inmovilización se adsorbió la mayor parte de la proteína al soporte (94.11%), sin embargo es probable que se haya originado la formación de estructuras inactivas o que limiten el acceso del sustrato al sitio activo, ya que se observa que la actividad catalítica disminuyó 1.6 veces.
- La naturaleza del solvente es determinante sobre la eficiencia catalítica. La actividad que retuvo la esterasa Stcl a las 72 horas de incubación con los distintos solventes se presentó en el siguiente orden; hexano > éter diisopílico > *tert*-butanol > acetona, lo cual corrobora que los solventes hidrofóbicos afectan en menor grado la actividad enzimática que los hidrofílicos.
- Después de 72 horas de incubación en los diferentes solventes evaluados, la condición que permitió que la enzima conservara la mayor actividad fue hexano a 37°C y por lo tanto fue bajo estas condiciones en la que se llevó a cabo la resolución enzimática.
- Se demostró que bajo las condiciones de estudio, tanto la esterasa Stcl como Novozym 435 son capaces de distinguir entre cada enantiómero de la mezcla racémica evaluada, mostrando preferencia hacia el isómero (R).
- La actividad de agua en el solvente influye de manera importante sobre la enantioselectividad de la enzima en la resolución del (*R,S*)-1-Feniletanol, se observó que un aumento en el  $a_w$  originó una disminución en la

enantioselectividad (E), esto como resultado de que el agua puede actuar en el medio como sustrato o como inhibidor competitivo.

- El éter diisopropílico, al ser menos hidrofóbico que el hexano, pudo haber ocasionado una disminución en la flexibilidad de la enzima, por lo tanto ejerció un efecto negativo en la síntesis enantioselectiva, ya que inactivó completamente a la StcI y ocasionó menor enantioselectividad y conversión para Novozym 435.
- Como consecuencia de la manipulación del tiempo de reacción,  $a_w$  en el solvente y naturaleza polar de este último, se logró determinar que ambas enzimas consiguen el mayor grado de conversión y enantioselectividad a las 120 horas de reacción en hexano con un  $a_w$  inicial de 0.066.
- A las condiciones de trabajo Novozym 435 exhibió valores más grandes en la conversión y enantioselectividad, cabe mencionar que al ser una enzima comercial la pureza que presenta es elevada, para generar a la StcI inmovilizada se partió de un extracto crudo, por lo tanto la pureza de dichos biocatalizadores puede llegar a ser muy distinta. Las diferencias en los resultados obtenidos pueden ser reflejo de tal consideración.
- De acuerdo al conocimiento que se tiene de que valores de E por arriba de 20 son los considerados útiles para resoluciones racémicas enzimáticas (Bornscheuer, 2006), se concluye que la enzima StcI de *Aspergillus nidulans*, al haber conseguido un valor de  $E = 31.31$ , demuestra ser un catalizador interesante, que puede ser agregado a los disponibles en el mercado.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. **Arroyo M.** (1998). Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. *Ars Pharmaceutica*. 39 (2): 23-39.
2. **Arroyo M.** (2000). Síntesis enantioselectivas catalizadas por lipasas microbianas. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*. 19-24.
3. **Berglund P.** (2001). Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. *Biomolecular Engineering*. 18: 13-22.
4. **Bornscheuer U.T, Kasche V, Buchholz K.** (2005). *Biocatalysts and Enzyme Technology*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim Alemania. pp 1-26.
5. **Bornscheuer U.T, Kazlauskas R.J.** (2006). *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations*. 2° ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim Alemania.
6. **Camacho-Páez B, Robles-Medina A, Camacho-Rubio F, González-Moreno P, Grima-Molina E.** (2003). Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*. 33: 845-853.
7. **Colombo G, Carrea G.** (2002). Modeling enzyme reactivity in organic solvents and water through computer simulations. *Journal of Biotechnology*. 96:23-33.
8. **da Silva V.C.F, Fabiano J, Carvalho C. Carvalho P.** (2008). Characterization and Catalytic Activity of Free and Immobilized Lipase from *Aspergillus niger*: a Comparative Study. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 19(8): 1468-1474.
9. **Ejima K, Liu J, Oshima Y, Hirooka K, Shimanuki S, Yokota Y, Hemmi H, Nakayama T, Nishino T.** (2004). Molecular Cloning and Characterization of a Thermostable Carboxylesterase from an Archeon *Sulfolobus shibatae* DSM5389: Non-Linear Kinetic Behavior of a

Hormone-Sensitive Lipase Family Enzyme. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 98(6): 445-451.

10. **Farbood M. I, Blocker R. W, Arvizzigno J, Muralidhara R.** (2003). Mixtures of optical isomers of styralyl alcohol or styralyl acetate, processes for preparing same and organoleptic uses thereof. United States Patent 6,511,686.
11. **Galagan J.E, Calvo S.E, Cuomo C, Ma L, Wortman J.R, Batzoglou S, Lee S, Bastürkmen M, Spevak C.C, Clutterbuck J, Kapitonov V, Kurka J, Scazzocchio C, Farman M, Butler J, Purcell S, Harris S, Braus G.H, Draht O, Busch S, D'Enfert C, Bouchier C, Goldman G.H, Bell-Pedersen D, GriffithsJones S, Doonan J.H, Yu J, Vienken K, Pain A, Freitag M, Selker E.U, Archer D.B, Peñalva M.A, Nierman W.C, Denning D.W, Caddick M, Hynes M, Paoletti M, Fischer R, Miller B, Dyer P, Sachs M.S, Osmani S.A, Birren B.W.** (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigates* and *A. oryzae*. *Nature*. 438: 1105-1115.
12. **García-Lepe R.O, Reyes F.** (1997). Esterses in autolysed cultures of filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*. 25:127-130.
13. **Ghanem A.** (2007). Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron*. 63(786):1721-1754.
14. **Ghanem A, Aboul-Enein H.Y.** (2004). Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron: Asymmetry*. 15: 3331-3351.
15. **Gitlesen T, Bauer M, Adlercreutz P.** (1997). Adsorption of lipase on polypropylene powder. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1345: 188-196.
16. **Graber M, Irague R, Rosenfeld E, Lamare S, Franson L, Hult K.** (2007). Solvent as a competitive inhibitor for *Candida antarctica* lipase B. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1774: 1052-1057.

17. **Guisan J.M.** (2006). *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*. 2° ed. Human Press Inc., Totowa, NJ. pp 15-26.
18. **Habulin M y Knez Z.** (2009). Optimization of (R, S)-1-phenylethanol kinetic resolution over *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.58: 24-28.
19. **Inaba C, Maekawa K, Morisaka H, Kuroda K, Ueda M.** (2009). Efficient synthesis of enantiomeric ethyl lactate by *Candida antarctica* lipase B (CALB)-displaying yeasts. *Biotechnological Products and Process Engineering*. 83:859-864.
20. **Itoh T, Han S, Matsushita Y, Hayase S.** (2004). Enhanced enantioselectivity and remarkable acceleration on the lipase-catalyzed transesterification using novel ionic liquids. *Green Chemistry*. 6: 437-439.
21. **Jing Q y Kazlauskas R.J.** (2008). Determination of Absolute Configuration of Secondary Alcohols Using Lipase-Catalyzed Kinetic Resolutions. *Chirality*. 20: 724-735.
22. **Jönsson Å, Wehtje E, Adlercreutz, Mattiasson B.** (1999). Thermodynamic and kinetic aspects on water vs. organic solvent as reaction media in the enzyme-catalysed reduction of ketones. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1430:313-322.
23. **Kato M, Fuchimoto J, Tanino T, Kondo A, Fukuda H, Ueda M.** (2007). Preparation of a whole-cell biocatalyst of mutated *Candida antarctica* lipase B (mCALB) by yeast molecular display system and its practical properties. *Applied Microbiology Biotechnology*. 75: 549-555.
24. **Klibanov A.M.** (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*. 49: 241-246.
25. **Kolling D.J, Suguino W.A, Brod F.C.A, Arisi A.C.M.** (2010). Immobilization of a Recombinant Esterase from *Lactobacillus plantarum*



- on Polypropylene Accurel MP1000. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 163 (2): 304-312.
26. **Kwon, Hoon C, Shin D.Y, Lee J.H, Kim S.W, Kang J.W.** (2007). Molecular Modeling and its Experimental Verification for the Catalytic Mechanism of *Candida antarctica* Lipase B. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17(7): 1098-1105.
27. **Léonard V, Fransson L, Lamare S, Hult K, Graber M.** (2007). A Water Molecule in the Stereospecificity Pocket of *Candida antarctica* Lipase B Enhances Enantioselectivity towards Pentan-2-ol. *ChemBioChem*. 8: 662-667.
28. **Liaquat y Apenten R.K.O.** (2000). Synthesis of Low Molecular Weight Flavor Esters Using Plant Seedling Lipases in Organic Media. *Journal of Food Science*. 65(2):295-299.
29. **Liu Y, Wang F, Tian T.** (2009). Effects of alcohol and solvent on the performance of lipase from *Candida* sp. In enantioselective esterification of racemic ibuprofen. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 56:126-130.
30. **Machado M.F y de Castro-Prado M.A.** (2001). Differential esterase expression in developmental mutants of *Aspergillus nidulans*. *Biochemical Genetics*. 39: 357-368.
31. **Magnusson A.O, Rotticci-Mulder J.C, Santagostino A, Hult K.** (2005). Creating Space for Large Secondary Alcohols by Rational Redesign of *Candida antarctica* Lipase B. *ChemBio Chem*. 6: 1051-1056.
32. **Nuno M, Soares M, Soares C.** (2007). Modeling hydration mechanisms of enzymes in nonpolar and polar organic solvents. *FEBS Journal*. 274: 2424-2436.
33. **Ogino H e Ishikawa H.** (2001). Enzymes Which Are Stable in the Presence of Organic Solvents. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 91(2): 109-116.

34. **Panda T, Gowrishankar B.S.** (2005). Production and applications of esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67:160-169.
35. **Park S, Kazlauskas R.J.** (2001). Improved Preparation and Use of Room-Temperature Ionic Liquids in Lipase-Catalyzed Enantio- and Regioselective Acylations. *Journal of Organic Chemistry*. 66: 8395-8401.
36. **Peña-Montes C, Lange S, Castro -Ochoa D, Ruiz-Noria K, Cruz-García F, Schmid R, Navarro-Ocaña A, Farrés A.** (2009). Differences in biocatalytic behavior between two variants of StcI esterase from *Aspergillus nidulans* and its potential use in biocatalysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 61: 225-234.
37. **Persson M, Costes D, Wehtje, Adlercreutz P.** (2002). Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity. *Enzyme and Microbial Technology*. 30:916-923.
38. **Pollard D.J y Woodley J.M.** (2006). Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends in Biotechnology*. 25(2): 66-73.
39. **Real-Cuatle L.** (2010) Inmovilización de la esterasa NstcI de *Aspergillus nidulans* y producción de compuestos bioactivos. Informe de estancia, Facultad de Química. UNAM.
40. **Rotticci-Mulder J.C, Gustavsson M, Holmquist M, Hult K, Martinelle M.** (2001). Expression in *Pichia pastoris* of *Candida antarctica* Lipase B and Lipase B Fused to a Cellulose-Binding Domain. *Protein Expression and Purification*. 21:386-392.
41. **Schmid R.D, Verger R.** (1998). Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. *Angewandte Chemie*. 37: 1608-1633.
42. **Schrader J, Etschmann M.M.W, Sell D, Hilmer J.-M, Rabenhorst J.** (2004). Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavor compounds-current industrial processes and future prospects. *Biotechnology Letters*. 26:463-472.

43. **Secundo F, Carrea G.** (2002). Lipase activity and conformation in neat organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 19-20: 93-102.
44. **Serra S, Fuganti C, Brenna E.** (2005). Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends in Biotechnology*. 23(4): 193-198.
45. **Shah S y Gupta M.N.** (2007). Kinetic resolution of ( $\pm$ )-1-phenylethanol in [Bmim][PF<sub>6</sub>] using high activity preparations of lipases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 17: 921-924.
46. **Sharma R, Chisti Y, Banerjee U.C.** (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. 19: 627-662.
47. **Suan C.L y Sarmidi M.R.** (2006). Effect of solvent and initial water content on (R, S)-1-phenylethanol resolution. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 551-556.
48. **Suan C.L y Sarmidi M.R.** (2004). Immobilised lipase-catalysed resolution of (R, S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 28: 111-119.
49. **Sun J, Jiang Y, Zhou L, Gao J.** (2010). Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption in organic medium. *New Biotechnology*. 27(1): 53-58.
50. **Tamalampudi S, Talukder R.M, Tanino T, Suzuki Y, Kondo A, Fukuda H.** (2007). Development of recombinant *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst expressing lipase-encoding gene from *Candida antarctica*. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*. 75:387-395.
51. **Vandamme E.J.** (2003). Bioflavours and fragrances via fungi and their enzymes. *Fungal Diversity*. 13: 153-166.
52. **Volcan-Almeida R, Vieira-Branco R, Peixoto B, da Silva-Lima O, Campbell-Alquerque S.M, Bonifácio-Martins O, Ceva-Antunes O.A, Guimaraes-Freire D.M.** (2008). Immobilization of a recombinant

- thermostable esterase (*Pf2001*) from *Pyrococcus furiosus* on microporous polypropylene: Isotherms, hyperactivation and purification. *Biochemical Engineering Journal*. 39: 531-537.
53. **Wu X.M, Xin J.Y, Xia C.G.** (2008). Lipase-catalysed kinetic resolution of secondary alcohols with improved enantioselectivity in propylene carbonate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 2421-2424.
54. **Yabe K, Nakajima H.** (2004). Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64: 745-755.
55. **Zawirska-Wojtasiak R.** (2006). Chirality and the Nature of Food Authenticity of Aroma. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 5(1):21-36.