



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ESTUDIO DE LA ENANTIOSELECTIVIDAD DE LA  
LIPASA DE *Bacillus pumilus* EN LÍQUIDOS  
IÓNICOS”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**YARETH GARCÍA TORRES**



**MÉXICO, D.F.**

**2012**



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:**                   **Profesor: Jesús Fernando Montiel Aguirre**  
**VOCAL:**                           **Profesor: J. Eleazar Martínez Barajas**  
**SECRETARIO:**               **Profesor: Ismael Bustos Jaimes**  
**1er. SUPLENTE:**           **Profesor: Vanessa Rebeca Maya Ampudia**  
**2° SUPLENTE:**               **Profesor: Sandra Paola Sánchez Rodríguez**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE FISICOQUÍMICA E INGENIERÍA DE PROTEÍNAS, TORRE DE INVESTIGACIÓN, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**Dr. Ismael Bustos Jaimes**

**SUSTENTANTE:**

---

**Yareth García Torres**

Este trabajo contó con recursos del programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), UNAM (Proyectos IN212607 e IN202710). Igualmente contamos con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Proyecto 53710).

Agradezco a **Dios** por la oportunidad que me da de vivir, por compartir esta etapa con la maravillosa familia que me concedió, por todas las personas que han sido parte de mi formación y que a lo largo de mi vida han dejado huella para poder cumplir esta meta. Por eso y más les doy las GRACIAS.

Papá y mamá agradezco su amor y apoyo incondicional en cada una de las decisiones de este largo camino, no tengo palabras para agradecerles el esfuerzo que han hecho para darme lo mejor de la vida.

**Papá** gracias por ser el mayor ejemplo de lucha constante y por enseñarme a que con esfuerzo y disciplina se puede alcanzar cualquier meta en la vida, gracias por consagrar tu vida a nuestra familia y por hacerme ver que la mayor virtud en una persona es la humildad y el amor. Sin tu ayuda esto no hubiera sido posible, no pude tener mejor papá que tú.

**Mamá** gracias por tu amor y paciencia, por tener siempre un momento de platica conmigo, gracias por dejar todos tus proyectos de vida a un lado y decidir vivir para nosotros, gracias por estar en cada uno de los momentos de felicidad, gracias porque en tiempos de tristeza y llanto siempre tienes una palabra de aliento y porque a pesar de mis enojos y berrinches siempre tienes una sonrisa en tu cara, eres la mejor.

Hermanas gracias por ser mi ejemplo de perseverancia, porque aún cuando tenemos que recorrer caminos diferentes, siempre hay un punto de encuentro entre nosotras, las quiero muchísimo.

**Itzhel** gracias por enseñarme a hacer las cosas de manera que dé lo mejor de mí para intentar alcanzar la perfección. Admiro la capacidad que tienes para enseñar y gracias a eso eres parte importante de este trabajo, gracias por ser mi “coach” y por hacerme ver el compromiso que hay al trabajar en un laboratorio. Sin tu ayuda, cada una de las experiencias de esta etapa hubieran sido más difíciles.

**Sabdy** gracias por la chispa que das en cada una de las situaciones de mi vida, porque para cada momento de alegría, tristeza, preocupación siempre tienes una frase para visualizar las cosas de mejor manera, gracias por hacerme ver que soy más que vencedora en este logro y gracias porque por ti, sé que nunca es demasiado tarde para lograr lo que me propongo.

**Carlos** agradezco inmensamente a Dios por haber cruzado nuestros caminos, y por la oportunidad que nos da de compartir este momento juntos. En primer lugar quiero agradecer tu amor incondicional, tu paciencia en este largo trayecto, gracias por ser la persona que siempre está apoyando mis decisiones y no cuestionarlas y aún cuando cometo errores siempre estás para remediarlos conmigo. No tengo palabras para agradecerte cada uno de los momentos de alegría que me has brindado y porque en los momentos de debilidad siempre estás para levantarme. Gracias por hacerme parte de tu vida y por compartir estos años juntos y que además seguimos contando... Te amo!

**Aidee** gracias por ser mi amiga fiel a lo largo de estos años, gracias por ser mi confidente, mi cómplice, mi equipo de laboratorio, formas parte de este logro porque eres pieza fundamental de este rompecabezas, el compartir contigo cada

una de las experiencias en las aulas de la facultad, esas mañanas de sueño, las tardes de hambre, esas largas llamadas para la elaboración de prácticas y cada uno de los momentos en la facultad, hacen que este título sea único. Gracias por aguantar mis cambios de humor, te agradezco por la oportunidad que me das de compartir cada una de tus nuevas experiencias y por esas palabras de positivismo para cualquier situación. Te quiero mucho amiga.

***ESTO ES POR Y PARA USTEDES***

# Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que han estado a lo largo de este camino, a aquellas que con su experiencia y conocimiento enriquecieron el contenido de este trabajo y así me permitieron concluir esta etapa.

Todo mi agradecimiento al Dr. Ismael Bustos Jaimes por la oportunidad que me dio de ser parte de su equipo de trabajo, por todas sus enseñanzas, por su paciencia para el desarrollo de este proyecto, además de la revisión de este escrito, por su apoyo y confianza en mí.

A los miembros del jurado de examen por la revisión de tesis y por sus sugerencias que hicieron mejor este escrito.

A mi primo Leonel por estar pendiente de todos mis planes, por fastidiar día a día y hacerme cómplice de sus locas ideas, por formar parte de mi familia y además por ser mi amigo. Gracias primo.

A mis amigos Jonathan, JC, Noel, Oscar por su interés y apoyo, por estar siempre pendientes de mí aún cuando el tiempo no está a nuestro favor y por su incondicional amistad.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de proteínas; Anaid, Paty, Rogelio, Hugo quienes me acompañaron en todo este tiempo, por compartir esos ratos de alegría y por su amistad.

***... Hasta aquí me ayudó el Señor***

1° Samuel 7: 12

---

# Índice

Abreviaturas utilizadas .....	1
Resumen .....	2
Capítulo 1. Lipasas.....	3
1.1    Introducción.....	3
1.2    Clasificación de las lipasas bacterianas .....	5
1.3    Estructura.....	7
1.4    Mecanismo catalítico.....	9
1.5    Aplicación industrial.....	11
1.6    Lipasas del género <i>Bacillus</i> .....	13
Capítulo 2. Lipasa de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1.....	15
2.1 <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 .....	15
2.2    Lipasa de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 .....	16
2.2.1    Parámetros cinéticos y estabilidad de la lipasa de <i>B. pumilus</i> y su mutante G28S.....	18
2.3    Enantioselectividad hidrolítica de la lipasa de <i>B. pumilus</i> y su mutante G28S.....	19
2.4    Inmovilización de enzimas .....	22
2.5    Propiedades generales de los líquidos iónicos .....	24
Capítulo 3. Objetivos .....	28
3.1    Objetivo general .....	28
3.2    Objetivos particulares.....	28
Capítulo 4. Materiales y métodos .....	29
4.1    Materiales.....	29
4.1.1    Reactivos químicos.....	29

---

4.1.2	Instrumentos y equipos.....	30
4.1.3	Enzimas.....	31
4.2	Desarrollo experimental .....	31
4.3	Métodos .....	32
4.3.1	Determinación de la actividad del catalizador.....	32
4.3.2	Reacciones de síntesis de estándares .....	33
4.3.3	Reacciones de síntesis catalizadas por enzimas.....	36
4.3.4	Análisis cromatográfico.....	38
4.3.5	Análisis cuantitativo de las reacciones de síntesis .....	40
Capítulo 5. Resultados y discusión .....		43
5.1	Determinación de la actividad de las lipasas .....	43
5.2	Análisis cromatográfico de las reacciones .....	44
5.3	Análisis cuantitativo de las reacciones de síntesis.....	65
Capítulo 6. Conclusiones y perspectivas.....		74
6.1	Conclusiones .....	74
6.2	Perspectivas .....	75
Bibliografía .....		76

---

## Abreviaturas utilizadas

BpIA	Lipasa de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 inmovilizada
BpIA-G28S	Lipasa de <i>B. pumilus</i> mutante Gly28Ser inmovilizada
CalB	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i> (Novozym 435)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
DMF	Dimetilformamida
ee	Exceso enantiomérico
[Emim][CH <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ]	Metanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazolio
[Emim][EtSO <sub>4</sub> ]	Etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio
E.I.	Estándar interno
FID	Detector de ionización de flama
HCl	Ácido clorhídrico
H <sub>2</sub> O	Agua
L.I.	Líquidos iónicos
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sodio
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sodio
r.p.m	Revoluciones por minuto
t <sub>r</sub>	Tiempo de retención
T <sub>r</sub>	Temperatura racémica
4-NFA	4-nitrofenil acetato

## Resumen

En las últimas décadas, las lipasas se han convertido en enzimas de gran potencial industrial debido a que catalizan diversas reacciones dependiendo de las condiciones del medio. Su función biológica consiste en catalizar la reacción de hidrólisis de los enlaces éster de los triacilglicéridos, produciendo ácidos grasos libres y glicerol. *In vitro* pueden hidrolizar otros ésteres, solubles o insolubles. En contraste, en ausencia de agua, las lipasas catalizan reacciones de síntesis de ésteres partiendo de alcoholes y ácidos orgánicos. Estas reacciones proceden con gran enantioselectividad y/o regioselectividad.

En el presente trabajo estudiamos la enantioselectividad de la lipasa de *Bacillus pumilus* (BpIA) y la mutante BpIA-G28S (Gly 28 Ser), usando como modelo la reacción de síntesis del éster de 1-feniletanol con ácido hexanoico usando como medio de reacción los líquidos iónicos metanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazolio ([Emim][CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]) o etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio ([Emim][EtSO<sub>4</sub>]). La mutante BpIA-G28S ha demostrado poseer una mayor actividad hidrolítica que la enzima silvestre frente a sustratos no quirales. En este estudio se llevaron a cabo reacciones a distintas temperaturas y los productos se analizaron mediante cromatografía de gases en fase quiral para lograr la separación de los enantiómeros del éster. Los resultados muestran que bajo las condiciones que se emplearon, las lipasas BpIA y BpIA-G28S poseen gran enantioselectividad y que ésta puede ser invertida mediante la manipulación de la temperatura de reacción.

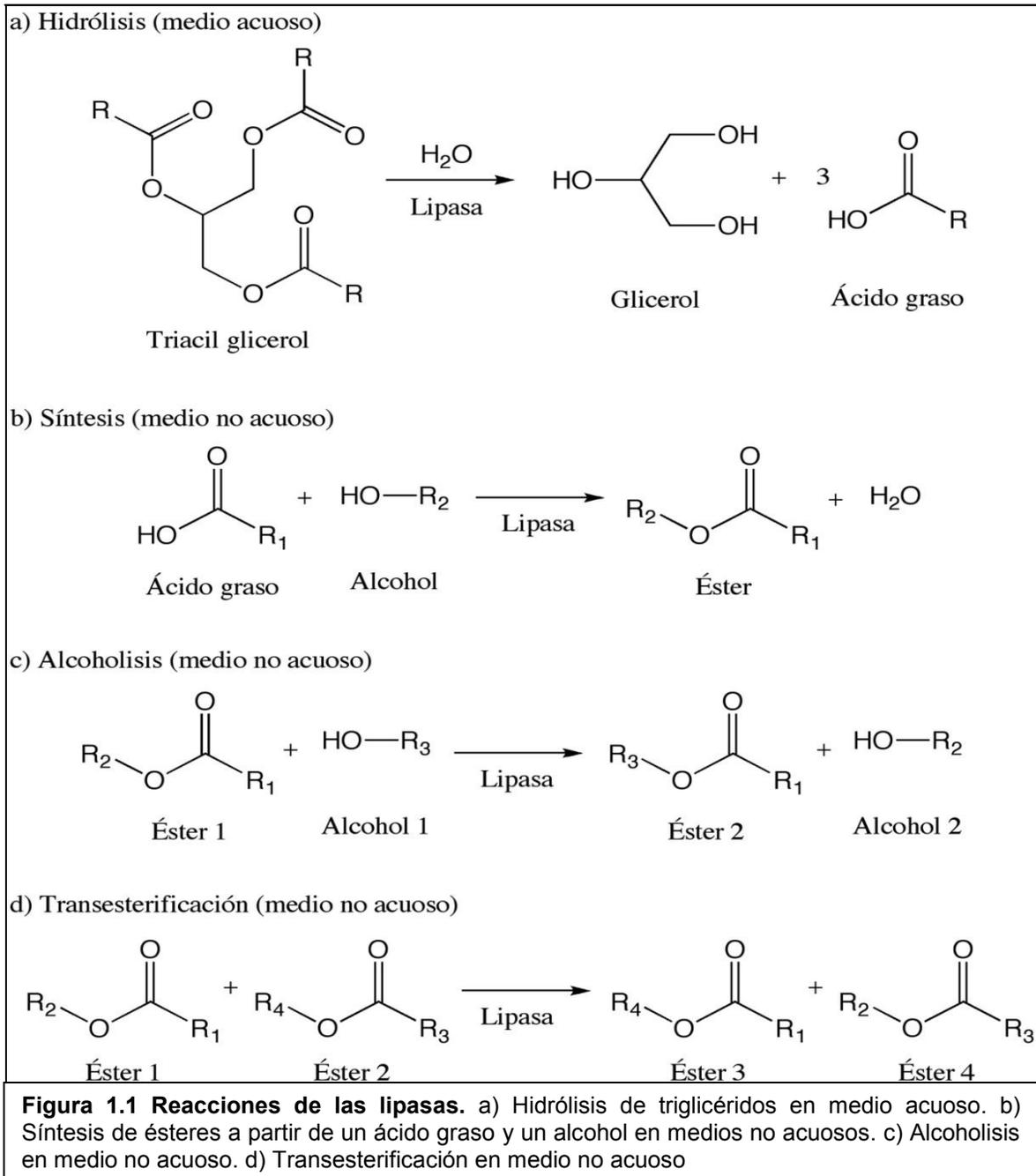
# Capítulo 1. Lipasas

## 1.1 Introducción

Las lipasas conocidas como triacilglicerol éster hidrolasas constituyen un grupo de enzimas con un gran potencial biotecnológico debido a su capacidad de catalizar reacciones de síntesis o hidrólisis, dependiendo del medio en el que se encuentren.

Las lipasas son enzimas que en medios con baja actividad acuosa realizan reacciones de síntesis de ésteres partiendo de alcoholes y ácidos grasos libres (Kumar y Gross, 2000), además de catalizar reacciones de hidrólisis de los enlaces éster presentes en los triacilglicéridos, produciendo ácidos grasos libres y glicerol (Figura 1.1).

Las lipasas se definen hoy en día como carboxilesterasas que catalizan la reacción de síntesis o hidrólisis de acilgliceroles de cadena larga, generalmente de diez o más átomos de carbono de longitud en la cadena de acilo (Ferrato y col., 1997).



Se les denomina “lipasa verdadera” a las enzimas que presentan principalmente dos propiedades: (a) un fenómeno llamado “activación interfacial” que se refiere a un evidente incremento de su actividad en presencia de una interfase lípido-agua

(Sarda y Desnuelle, 1958), y (b) una “tapa” que cubra el sitio catalítico (Brzozowski y col., 1991; Derewenda y col., 1992; van Tilbeurgh, y col., 1993).

Tanto la activación interfacial como la presencia de la tapa cubriendo al sitio activo suelen ser fenómenos asociados, pero en la realidad existen varias lipasas que no cumplen con alguna o ambas propiedades.

## 1.2 Clasificación de las lipasas bacterianas

Debido a la enorme distribución de las enzimas en la naturaleza y a que las encontramos tanto en animales, plantas y microorganismos, las lipasas de origen microbiano, principalmente aquellas de levaduras y bacterias, son las más utilizadas en aplicaciones biotecnológicas, por lo que son objeto de intenso estudio por su gran potencial industrial (Kynclova y col., 1995; Toida y col., 1998; Jaeger y Reetz, 1998; Kazlauskas y Bornscheuer, 1998). Las lipasas fueron clasificadas por Arpigny y Jaeger (1999) con base en la comparación de sus secuencias de aminoácidos y algunas propiedades biológicas fundamentales. La clasificación original comprende alrededor de 50 enzimas agrupadas en 6 familias:

- **Familia I:** Comprende a 22 miembros que están agrupados en 6 subfamilias:
  - Subfamilia I.1 y I.2, lipasas secretadas por la vía tipo II (para su secreción requieren de un transportador externo).

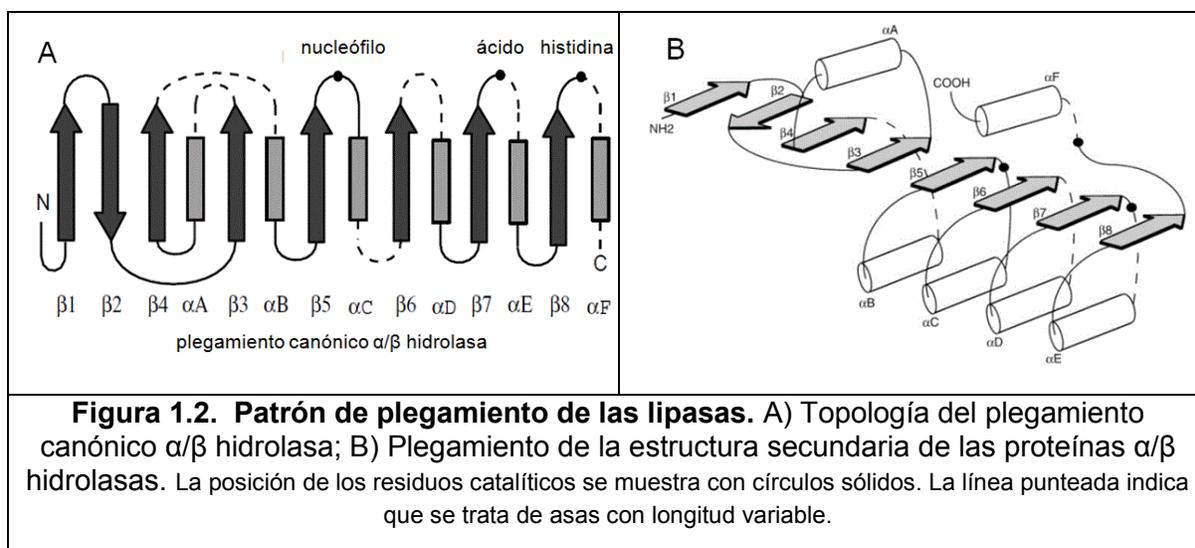
- Subfamilia I.3, la ruta de secreción es del tipo I (se autotransportan) (Jaeger y eggert, 2002).
  - Subfamilia I.4, son las lipasas más pequeñas (19 a 21 kDa). Tienen intervalos de pH óptimo alcalinos y preferencia hacia los triacilglicéridos de cadena corta como sustratos (<10 átomos de carbono en la cadena del acilo).
  - Subfamilia I.5, son lipasas con características de fosfolipasa.
  - Subfamilia I.6, comprende a lipasas de los géneros *Propionibacterium* y *Streptomyces*.
- **Familia II:** Esta familia agrupa a las “nuevas lipasas” con funciones desconocidas.
  - **Familia III:** Comprende las lipasas extracelulares de *Streptomyces* sp. y las cepas psicrófilas de *Moraxella* sp. El aspartato catalítico de estas enzimas se encuentra en una posición no equivalente respecto a las lipasas de las demás familias.
  - **Familia IV:** A esta familia pertenecen las lipasas que muestran similitud con las lipasas sensibles a hormonas de mamíferos (LSH). Las proteínas de este grupo muestran gran actividad a bajas temperaturas (menos de 15°C).
  - **Familia V:** Estas lipasas, al igual que las LSH, se encuentran en bacterias mesófilas (*Pseudomonas oleovorans*, *Haemophilous influenzae* o *Acetobater pasteurianus*), psicrófilas (*Moraxella* sp., *Psy. Immobilis*) y termófilas (*Sulfolobus acidocaldarius*). Las proteínas de este grupo muestran una similitud de secuencia significativa (20-25%) con varias

enzimas bacterianas no-lipolíticas como deshalogenasas, haloperoxidasas y éoxido hidrolasas, incluso comparten similitud estructural (Verschuere y col., 1993; Misawa y col., 1998).

- **Familia VI:** Incluye esterases que han sido parcialmente identificadas de las secuencias del genoma. Estas esterases son pequeñas proteínas localizadas en el citoplasma bacteriano con similitud a las lipofosfolipasas de mamíferos (Arpigny y Jaeger, 1999).

### 1.3 Estructura

En las lipasas el patrón de plegamiento es el común de una  $\alpha/\beta$  hidrolasa (Ollis y col., 1992). Este patrón consiste en una hoja  $\beta$  central que típicamente cuenta con 8 hebras paralelas, excepto la segunda hebra que es antiparalela. Las hebras  $\beta_3$  a  $\beta_8$  están conectadas por hélices  $\alpha$ , las cuales están unidas a cada lado de la hoja  $\beta$  central. Mediante estudios realizados por cristalografía de rayos X se sabe que el sitio catalítico de las lipasas se localiza en el carboxilo terminal de la hoja  $\beta$  central, el cual comprende tres residuos catalíticos: un residuo nucleófilo (Ser, Cys o Asp), un residuo ácido (Asp o GLu), y un residuo de histidina, siempre en este orden en la secuencia de aminoácidos (Figura 1.2).



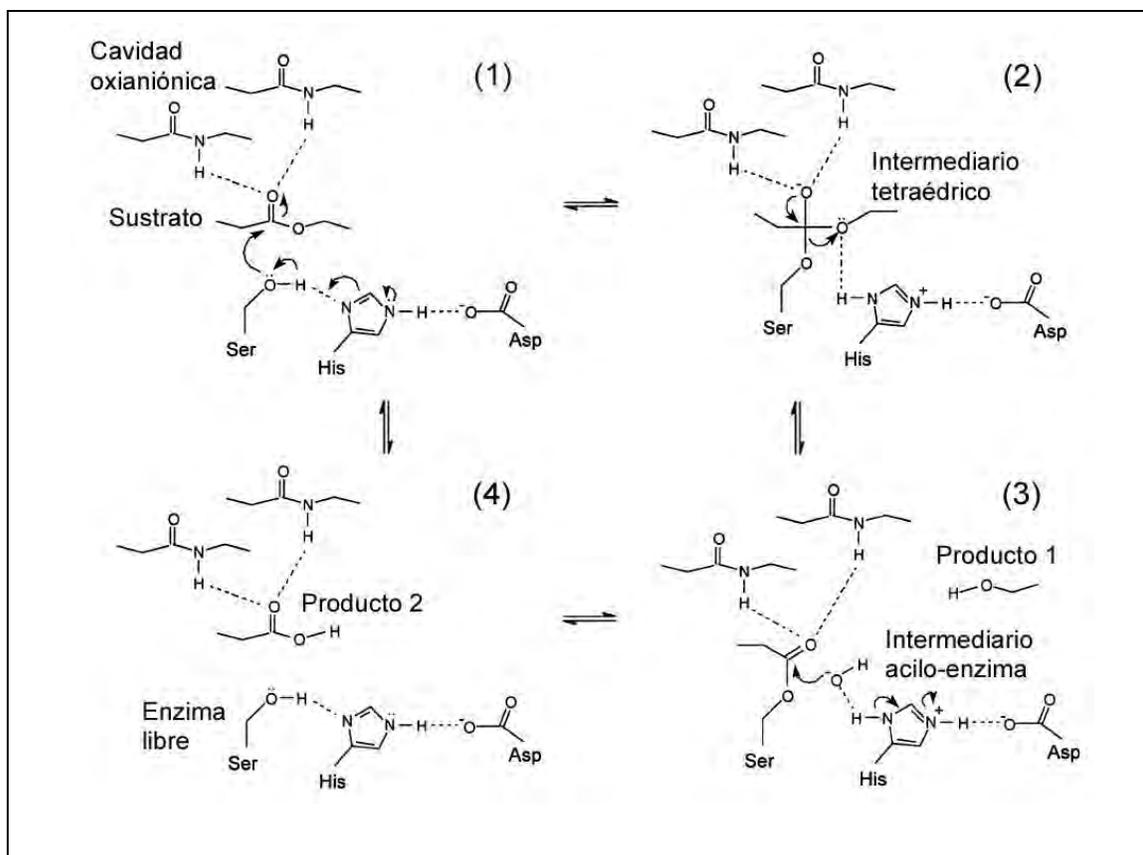
El nucleófilo en las lipasas bacterianas es el residuo de serina, que se encuentra localizado en un pentapéptido altamente conservado (Gly-X-Ser-X-Gly), de manera que forma parte de una hebra  $\beta$  seguida de un giro rígido que contiene al residuo de serina y, en seguida, una hélice  $\alpha$ . A este arreglo se le conoce como  $\beta$ - $\epsilon$ Ser- $\alpha$  (Derewenda y Sharp, 1993). De esta forma el residuo nucleófilo se acomoda en la superficie del sitio activo y así permite acceder fácilmente por un lado al residuo de histidina y por el otro lado al sustrato. El segundo residuo catalítico (Asp) está localizado en el asa que conecta la hebra  $\beta 7$  con la hélice  $\alpha E$ , mientras que la histidina, que es el tercer residuo catalítico, se encuentra en un asa que sigue a la hebra  $\beta 8$  de la hoja central.

## 1.4 Mecanismo catalítico

Las lipasas tienen la capacidad de catalizar reacciones de hidrólisis sobre los enlaces éster presentes en los acilgliceroles. Por ejemplo, en sistemas acuosos, cuando la hidrólisis del sustrato se lleva a cabo por completo, tenemos como producto la liberación de ácidos grasos y glicerol, pero en casos cuando el medio de reacción es orgánico se llevan a cabo reacciones de esterificación, tales como, alcoholisis, aminólisis y tiólisis (Kumar y Gross, 2000).

El primer paso del mecanismo químico que describe la reacción de hidrólisis de lípidos por la acción de las lipasas consiste en el ataque nucleofílico al carbono del carbono carbonílico que se encuentra formando el enlace éster. Este ataque se lleva a cabo por el átomo de oxígeno procedente del grupo hidroxilo que está presente en residuo de serina de la triada catalítica; en este paso se lleva a cabo la formación de un intermediario tetraédrico que se caracteriza por poseer una carga negativa en el átomo de oxígeno y además de estar estabilizado mediante puentes de hidrógeno establecidos con un par de grupos NH (amida del enlace peptídico), en el que una cavidad de la proteína adopta una configuración estructural en relación al oxianión llamada "cavidad oxianiónica". Uno de los grupos NH con los que se establecen los puentes de hidrógeno provienen de un residuo que está localizado detrás de la serina nucleofílica, el otro residuo que estabiliza al intermediario mediante un grupo NH está colocado en la porción final de la hoja  $\beta$ 3. El ataque nucleofílico por parte de la serina es favorecido por el residuo de histidina, cuyo papel consiste en recibir el protón proveniente del grupo

hidroxilo presente en la serina. Este ataque es favorecido por la presencia de un ácido que orienta el anillo del imidazol de la histidina y neutraliza de manera parcial la carga recién generada en él y posteriormente cede este protón al oxígeno del enlace éster para formar un alcohol. En este punto el componente ácido del sustrato es esterificado por la serina nucleofílica (intermediario unido covalentemente), mientras que el alcohol es liberado. La reacción continúa con un paso de desacilación, en donde una molécula de agua participa hidrolizando al intermediario covalente. La histidina catalítica activa a esta molécula de agua quitándole un protón al oxígeno, el cual ataca nucleofílicamente al carbono carbonílico del intermediario covalente que, a través de un mecanismo idéntico al que usó la serina catalítica para romper el éster, libera al componente acilo que se encontraba unido covalentemente a la serina, formando un ácido carboxílico. Posteriormente, la histidina cede un protón al oxígeno del residuo activo de serina para regenerar el alcohol. Después de la difusión del ácido carboxílico producido, la enzima se encuentra disponible para un nuevo ciclo catalítico (Figura 1.3).



**Figura 1.3. Mecanismo de reacción de las lipasas.** 1) Activación del residuo nucleófilo de serina y ataque nucleofílico al carbono carbonilo del enlace éster. 2) Formación del intermediario tetraédrico, reorganización electrónica previa a la liberación del motivo alcohólico del éster y formación del intermediario covalente ("acil-enzima"). 3) Una molécula de agua es activada por el residuo de histidina que se encuentra próximo, el ión hidroxilo resultante ataca al átomo de carbono carbonilo del intermediario covalente ocurriendo así la liberación del alcohol (producto 1). 4) El residuo de histidina dona un protón al átomo de oxígeno del residuo activo de serina, el enlace éster entre la serina y el componente acilo se rompe para liberar al componente ácido (producto 2) y para que la enzima se encuentre disponible para un nuevo ciclo catalítico.

## 1.5 Aplicación industrial

Las lipasas representan un grupo muy versátil de enzimas bacterianas extracelulares que poseen la capacidad de desarrollar una variedad de reacciones

muy importantes. Una de las funciones fisiológicas de las lipasas es hidrolizar los enlaces éster carboxílicos en diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos y glicerol. Además que las lipasas pueden catalizar reacciones de esterificación, interesterificación y transesterificación en medios no acuosos. Esta variedad de funciones hace a las lipasas, enzimas con aplicaciones potenciales en la industria de alimentos, detergentes, farmacéuticos, agroquímicos, pieles, textiles, cosméticos, perfumería, papel, además de poder usarse como biosensores y en procesos de bioremediación.

Las lipasas aisladas de diferentes microorganismos han sido estudiadas extensamente y con base en sus propiedades, peso molecular, pH óptimo, temperatura óptima, estabilidad y especificidad de sustrato, han sido utilizadas en varias industrias. Las lipasas son importantes biocatalizadores debido a su alta estabilidad en solventes orgánicos y el comportamiento quimio-, regio- y enantioespecífico que presenta su catálisis (Hasan y col., 2006).

A continuación se resumen algunas de las aplicaciones de las lipasas en diferentes industrias:

**Industria alimenticia:** La posición, longitud y grado de insaturación de los triacilgliceroles influyen fuertemente, tanto en las propiedades físicas como en el valor nutrimental de los alimentos. Los ácidos grasos, producidos por la acción hidrolítica de lipasas, pueden determinar la aparición de sabores y olores deseables o indeseables.

**Industria de los detergentes:** La adición de lipasas a detergentes es una de las

aplicaciones más importantes de las lipasas, ya que los detergentes son utilizados principalmente en hogares y lavanderías industriales, además de la reducción del gasto energético y la carga ambiental.

**Industria farmacéutica:** Algunas lipasas han sido utilizadas para la síntesis de medicamentos, como lo es la lipasa de *Candida rugosa* que ha sido utilizada para sintetizar lovastatina, que es un medicamento que disminuye los niveles de colesterol. De igual manera la lipasa de *Serratia marcescens* es utilizada en la hidrólisis asimétrica del 3-fenilglicinato, el cual es un intermediario clave en la síntesis del clorhidrato de diltiazem, que es un vasodilatador ampliamente usado.

**Industria cosmética:** Las lipasas son ampliamente utilizadas en productos dirigidos al cuidado de la piel, como es el caso de algunos derivados del retinol, que son preparados por reacciones catalíticas de lipasas inmovilizadas.

## 1.6 Lipasas del género *Bacillus*

Dentro de las lipasas del género *Bacillus* existen dos grupos; las lipasas de alto peso molecular de la subfamilia I.5 y las lipasas de peso molecular menor agrupadas en la subfamilia I.4.

Las lipasas de la subfamilia I.4 son las lipasas más pequeñas conocidas con un peso molecular de 19-20 kDa. En el año de 1999 sólo se encontraban clasificadas dentro de esta subfamilia tres enzimas, dos lipasas de *Bacillus subtilis* (LipA y

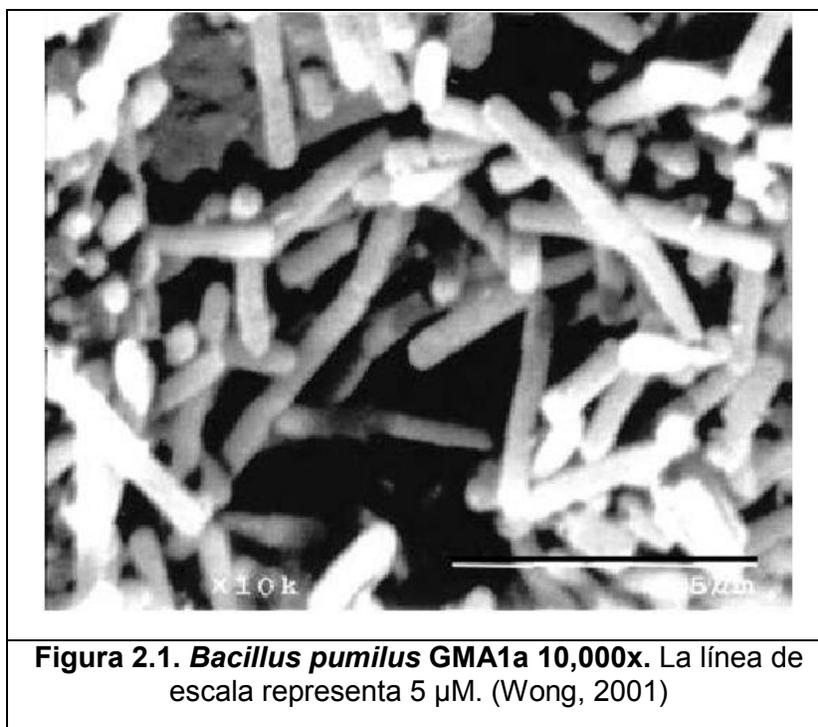
LipB) y una lipasa de *Bacillus pumilus* que comparte un 74% de identidad de secuencia con respecto a la LipA de *B. subtilis*. Esta última enzima pertenece a la subfamilia I.4 y es la que ha sido más estudiada y de la que se cuenta con la estructura tridimensional (Van Pouderoyen y col., 2001).

La lipasa A de *B. pumilus* es homóloga a la lipasa A de *B. subtilis*, ya que ambas comparten una identidad de secuencia cercana al 75% y por tal motivo permite comparar a ambas lipasas en cuanto a estructura y propiedades catalíticas. Este nivel de identidad permite asumir que comparten el mismo plegamiento y que las diferencias en estabilidad y propiedades catalíticas se deben a la sustitución de residuos en su secuencia.

## Capítulo 2. Lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1

### 2.1 *Bacillus pumilus* GMA1

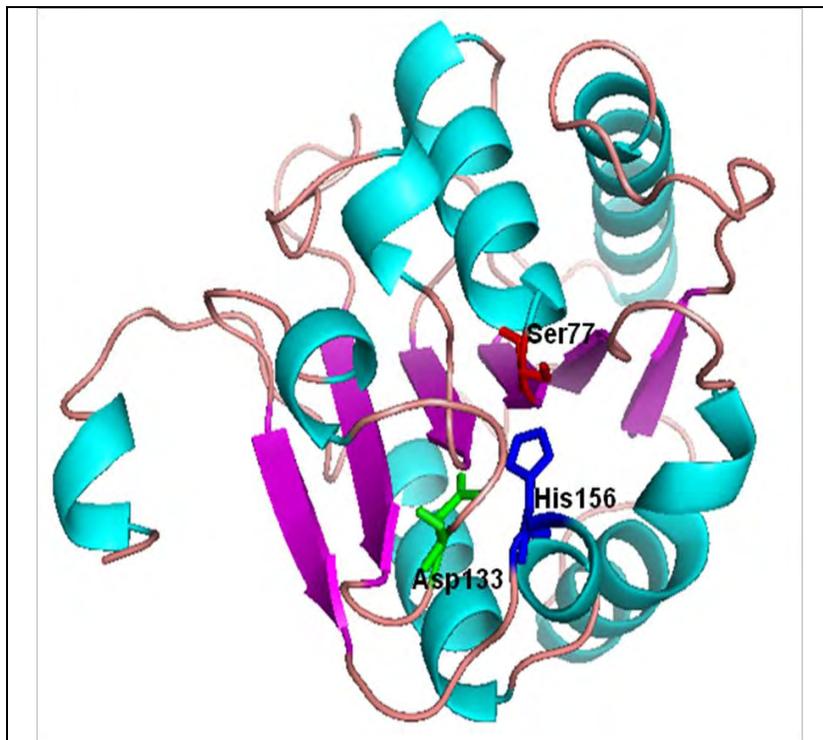
*Bacillus pumilus* GMA1 (Figura 2.1) es un microorganismo aislado en 1995 de las aguas termales de Los Azufres, Michoacán. Fue seleccionado en un tamizaje para aislar microorganismos lipolíticos. La cepa fue identificada por métodos bioquímicos como *Bacillus pumilus*, a esta cepa se le denominó GMA1 (Bustos, 1995). De acuerdo a resultados reportados anteriormente sobre el aislamiento del microorganismo señalan que éste produce una lipasa con un peso molecular aproximado de 21 kDa a un pH de 10.5 y a una temperatura óptima de 50°C, además presenta preferencia por ácidos grasos de cadena corta y (Bustos, 1998; Wong, 2001).



## 2.2 Lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1

El gen de la lipasa de *B. pumilus* GMA1 ha sido secuenciado y la traducción del mismo revela que la enzima es homóloga a lipasa A de *B. subtilis* (Bustos, 1998). En su forma madura estas lipasas poseen 181 residuos de aminoácidos y tienen un peso aproximado de 19.5 kDa. Con base en los datos cristalográficos reportados para la lipasa A de *B. subtilis*, se modeló por homología la estructura de la lipasa de *B. pumilus* GMA1, ya que cuentan con un 80% de identidad entre ambas proteínas (Mora, 2008). La estructura de la lipasa A de *B. subtilis* muestra una molécula globular con un plegamiento clásico  $\alpha/\beta$  hidrolasa con 6 hebras- $\beta$  paralelas flanqueadas por 5 hélices  $\alpha$  (Figura 2.2). La triada catalítica corresponde a los residuos de Ser77, Asp133 e His156, en tanto que la cavidad oxianiónica

está formada por los grupos amida de los residuos Ile12 y Met78 y estos residuos se están en posiciones muy similares a las encontradas en otras lipasas de estructura conocida. En la lipasa A de *B. subtilis* no se observa la presencia de la tapa, por lo que el sitio activo se encuentra expuesto al disolvente.



**Figura 2.2. Modelo estructural de BpIA.** Se resaltan los residuos catalíticos Ser77, Asp133 e His156. El modelo se realizó con el programa Phyre2. La imagen del modelo se realizó utilizando el programa Pymol.

### 2.2.1 Parámetros cinéticos y estabilidad de la lipasa de *B. pumilus* y su mutante G28S

En el año de 2008, Mora estudió los parámetros cinéticos y la estabilidad térmica de la lipasa recombinante de *B. pumilus* GMA1 y algunas de sus mutantes. En algunos de los resultados obtenidos se observó una disminución considerable en la  $K_m$ , mientras que la  $k_{cat}$  no varió considerablemente con la temperatura, lo cual implica un aumento considerable en la especificidad de la enzima hacia el sustrato debido al cambio de temperatura. Por otra parte, la estabilidad presentó una relación inversamente proporcional al aumento de temperatura, como era de esperarse.

En cuanto a la mutante G28S, que se propuso como un residuo que podría tener impacto en la termoestabilidad de la enzima, se demostró que el residuo de glicina 28 (G28) no juega un papel importante en la estabilidad. En cambio, la mutación por serina en esta posición (S28) si tienen un efecto relevante en el cambio de las constantes cinéticas, al mejorar la eficiencia catalítica de la enzima con el aumento de temperatura (Bustos y col., 2010). La mutante G28S en la lipasa de *B. pumilus* resultó ser de gran interés biotecnológico ya que, aunque no es termoestable, aumentó tres veces su  $k_{cat}$  y aumentó a más del doble la vida media a 20°C con respecto a la enzima parental. En la tabla 2.1 se presentan algunos de los resultados obtenidos (Mora, 2008).

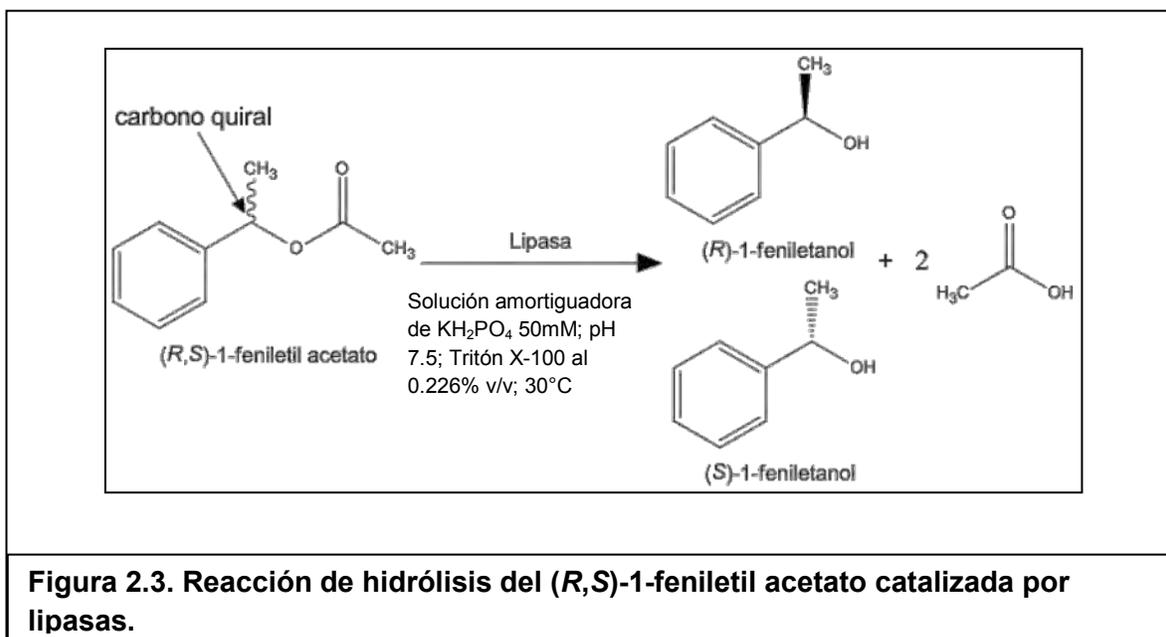
Tabla 2.1. Parámetros cinéticos y termoestabilidad de las lipasas BpIA y BpIA-G28S.						
Enzima	Propiedades catalíticas*				Estabilidad*	
	Temperatura	$K_m$	$k_{cat}$	$k_{cat}/K_m$	$k_{ie}$	$t_{1/2}$
	(°C)	( $\mu\text{M}$ )	( $\text{min}^{-1}$ )	$\times 10^2$ ( $\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ )	$\times 10^5$ ( $\text{min}^{-1}$ )	(min)
<b>BpIA</b>	20	726.48	86.28	11.88	0.76	9120.4
	25	400.67	51.10	12.75	61.74	112.3
	30	245.28	44.50	18.14	152.50	45.5
	35	97.56	45.51	46.65	291.40	23.8
	40	108.46	66.28	61.11	898.10	7.7
<b>BpIA-G28S</b>	20	101.18	247.16	24.69	0.30	23104.9
	25	662.27	229.14	34.60	2.44	2840.8
	30	383.41	208.42	54.36	112.20	61.8
	35	250.30	228.13	91.14	169.10	41.0
	40	195.24	259.20	132.76	1198.0	5.8

\*valores obtenidos a pH 7.5 y Tritón X-100 1% v/v.  
 $k_{ie}$  constante de inactivación térmica  
 $t_{1/2}$  vida media

### 2.3 Enantioselectividad hidrolítica de la lipasa de *B. pumilus* y su mutante G28S

Las lipasas de *Bacillus pumilus* son enzimas capaces de catalizar reacciones de hidrólisis de los enlaces éster que se encuentran presentes en los triacilglicéridos (Alcántara, 2009). Los productos de estas reacciones son ácidos grasos libres y glicerol. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza de la lipasa y de sus condiciones de actividad, también pueden obtenerse como productos mono ó

diglicéridos con diferencias en las posiciones finales de esterificación [Godtfredsen, 1990]. En 2012, Santillán estudió la enantioselectividad de las enzimas BplA y BplA-G28S. Su trabajo consistió en evaluar la enantioselectividad de estas proteínas para hidrolizar el (*R,S*)-1-feniletil acetato (Figura 2.3).



Del análisis por cromatografía de gases en fase quiral de estas reacciones se desprende el hecho de que ambas lipasas catalizaron la reacción de hidrólisis de forma enantioselectiva, con preferencia por el enantiómero *R*. El producto de la hidrólisis en ambos casos fue, mayoritariamente, el (*R*)-1-feniletanol, cuyo exceso enantiomérico obtenido fue del 89.2% para el caso de la BplA y de un 78.5% por acción de la BplA-G28S. Aunque la diferencia porcentual no es muy significativa, los valores obtenidos pudieran estar asociados a que BplAr-G28S por sus características estructurales, posee mayor libertad para transitar entre los

diferentes estados que ésta adopta para efectuar el proceso catalítico ( $E + S \rightarrow ES \rightarrow ES' + P_1 \rightarrow E + P_2$ ), reduciendo así la enantioselectividad de la reacción.

Por otro lado, a pesar de que la BplA-G28S posee mayor actividad catalítica que la BplA y de que la constante de inactivación enzimática ( $k_i$ ) de la BplA-G28S resultó inferior que la obtenida para la BplA, el rendimiento de la reacción de hidrólisis catalizada por la BplA-G28S no fue significativamente superior, como se muestra en la tabla 2.2.

<b>Tabla 2.2. Resultados del análisis cuantitativo de las muestras obtenidas a partir de las reacciones de hidrólisis catalizada por las lipasas BplA y BplA-G28S en presencia de BSA.</b>				
Muestra extraídas con una eficiencia del 65.1%	(S)-1-feniletil acetato (mM)	(R)-1-feniletil acetato (mM)	Rendimiento (%)	ee= $[(R - S) / (R + S)] * 100$ (%)
Reacción testigo	2.46 ± 0.15	2.74 ± 0.14		
Reacción catalizada por BplAr-6H	2.30 ± 0.04	0.27 ± 0.01	47.4 ± 2.28	89.2 ± 4.5
Reacción catalizada por BplAr-6H-G28S	2.08 ± 0.13	0.22 ± 0.01	48.4 ± 2.86	78.5 ± 3.1

En este estudio concluyen que las lipasas BplA y BplA-G28S, frente al (R,S)-1-feniletil acetato, presentan preferencia por el enantiómero R, además de que la presencia de BSA en los medios de reacción incrementó los rendimientos hasta en un 11.3%, con respecto a la reacción sin BSA, y elevó la enantioselectividad para obtener valores de ee superiores al 89% (Santillán, 2012).

## 2.4 Inmovilización de enzimas

La definición de inmovilización incluye todo aquel proceso por el cuál se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, organelos, células, etc., mediante su unión a un soporte (Barros y col., 1998).

Algunos de los beneficios de utilizar enzimas inmovilizadas en lugar de las enzimas solubles son:

- a) Reducción de costos de producción mediante procesos de reutilización eficientes y controlables.
- b) Adsorbentes selectivos para purificación de proteínas y enzimas.
- c) Herramientas fundamentales para química de proteínas en fase sólida.
- d) Microdispositivos para producción controlada de fármacos.

Es importante mencionar que, sin importar la forma en que fueron preparadas, las enzimas inmovilizadas deben cumplir con dos funciones esenciales (Suan y col., 2004):

- ❖ Las funciones no catalíticas, que se refiere a la eficiente separación del medio de reacción y la reutilización del biocatalizador.
- ❖ Las funciones catalíticas, que comprenden la capacidad de la enzima de convertir los sustratos en los productos deseados en el tiempo requerido.

Existen cuatro categorías de interacción física entre la enzima y el soporte (Kourkoutas y col., 2004):

- a) Unión sobre una superficie sólida.
- b) Atrapamiento en una matriz porosa.
- c) Agregación por floculación o con agentes entrecruzantes.
- d) Inclusión en membranas

Una de las ventajas más importantes de las enzimas inmovilizadas comparadas con las enzimas libres, es la reusabilidad, ya que la inmovilización de éstas facilita la separación de la enzima en los reactantes y de los productos. Otra ventaja de la inmovilización de los productos son los bajos costos, ya que estos catalizadores suelen producirse comercialmente, ya que recientemente ha habido un notable incremento en su uso.

Los métodos de inmovilización son muy variados, pueden ser por métodos químicos donde la unión es a través de enlaces covalentes, o físicos por medio de adsorción en sólidos o atrapamiento en redes tridimensionales en matrices de gel o micro cápsulas.

En la inmovilización de enzimas, un factor importante, es el material en el que éstas se inmovilizarán. Pueden ser de dos tipos:

- Hidrofílicos: celita, sílica gel, carbón activado y sefarosa.
- Hidrófobos: polietileno, poliestireno y acrílicos

## 2.5 Propiedades generales de los líquidos iónicos

Un área concurrente en la investigación en biotecnología es la de las reacciones que se llevan a cabo en medios no convencionales, implicando sistemas de reacciones con un contenido de agua reducido, como pueden ser los solventes orgánicos (hexano, tolueno, ciclohexano). Sin embargo el trabajar con este tipo de disolventes puede resultar peligroso, por su toxicidad, por ser inflamables, por su alta volatilidad, además que no se pueden utilizar a temperaturas altas a condiciones normales de presión atmosférica, es por eso que una alternativa son los líquidos iónicos (LI) (Lozano y col., 2003).

Los LI son sales orgánicas, es decir, están compuestos por iones y tienen la propiedad de ser líquidas a temperatura ambiente. Entre las principales propiedades que los hacen excelentes medios de reacción están: no son inflamables, debido a su baja presión de vapor no son volátiles, y tienen una gran estabilidad térmica.

Una de las principales propiedades de los LI es su alta polaridad. La polaridad de estos compuestos es muy similar a la que presentan los alcoholes de bajo peso molecular como el metanol (Kibanov, 2001).

Por otro lado, generalmente los LI son inmiscibles con muchos solventes orgánicos, especialmente con los no polares, como el hexano, mientras que

pueden ser miscibles con solventes más polares como el diclorometano, cloroformo o tetrahidrofurano.

Una desventaja de los LI en relación con los solventes orgánicos comunes, es que los LI son mucho más viscosos. Mientras que el rango de viscosidad de los LI se encuentra entre 35-500 cP, la viscosidad de los solventes orgánicos es menor, como por ejemplo el tolueno cuya viscosidad es de 0.6 cP a 25°C (Zhen Yang, 2005).

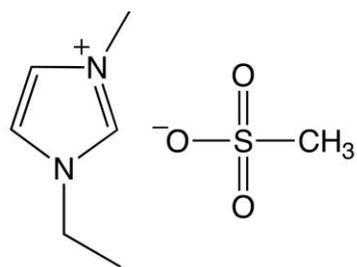
La viscosidad de un líquido iónico, se debe a la formación de puentes de hidrógeno, por lo que estas interacciones pueden verse disminuidas con un incremento en la temperatura o por la adición de algunos solventes orgánicos (Elliot y col., 1991).

En los últimos años, se ha estudiado el comportamiento de los líquidos iónicos, simplemente para identificar sus ventajas para la catálisis enzimática y esto debido a que carecen de presión de vapor se consideran como disolventes verdes, además que, a diferencia de los disolventes orgánicos de polaridad similar, estas siempre inactivan las enzimas.

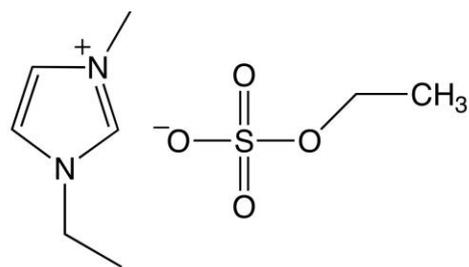
En estudios recientes acerca de las reacciones de catálisis en líquidos iónicos, muestran que se tiene una mayor selectividad, mayor velocidad de reacción y mayor estabilidad de la enzima, a pesar de las desventajas que presentan como su alto grado de viscosidad. Se ha demostrado que aún cuando se considera al agua como el disolvente tradicional para la catálisis enzimática, algunas de las reacciones como la reacción de condensación, se lleva a cabo con un mejor

rendimiento en disolventes orgánicos, pero en el año 2000 se demostró que los disolventes orgánicos pueden ser sustituidos por los líquidos iónicos, gracias a las propiedades que poseen. Otra de las ventajas de utilizar líquidos iónicos en catálisis enzimática, es que en algunos casos las lipasas y las proteasas son más enantioselectivas que en disolventes orgánicos (Seongsoon, P y col., 2003). Es por tal motivo que en el presente trabajo se planteó el estudio de la enantioselectividad de las lipasas de *Bacillus pumilus* en líquidos iónicos.

Las lipasas de *Bacillus pumilus*, BpIA y su mutante BpIA-G28S, son catalizadores interesantes debido a la alta enantioselectividad hidrolítica de ésteres quirales. En este trabajo nos propusimos estudiar la enantioselectividad de las enzimas BpIA y BpIA-G28S en el sentido sintético, para lo cual seleccionamos la reacción modelo de síntesis de 1-feniletal acetato a partir de (*R,S*)1-feniletanol y ácido hexanoico. La reacción se realizó en los líquidos iónicos metanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazolio ([Emim][CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]) o etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio ([Emim][EtSO<sub>4</sub>]) (Figura 2.4) y se varió la temperatura para analizar el efecto de ésta en la enantioselectividad y el rendimiento.



Metanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazolio  
([Emim][CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>])



Etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio  
([Emim][EtSO<sub>4</sub>])

**Figura 2.4. Estructura de LI utilizados como medio de reacción en las reacciones de síntesis**

## Capítulo 3. Objetivos

### 3.1 Objetivo general

- Estudiar la enantioselectividad de las enzimas BplA y BplA-G28S en líquidos iónicos.

### 3.2 Objetivos particulares

- Determinar la actividad específica de los catalizadores (lipasas inmovilizadas en sílica gel).
- Seleccionar la temperatura para el ensayo.
- Seleccionar el programa de separación cromatográfica.
- Seleccionar los tiempos de reacción adecuados.
- Llevar a cabo el análisis cuantitativo de los ensayos.

---

## Capítulo 4. Materiales y métodos

En este capítulo se especifican las sustancias y los equipos utilizados, así como los procedimientos seguidos para lograr el estudio de la enantioselectividad de la lipasa de *Bacillus pumilus* en líquidos iónicos.

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1 Reactivos químicos

Reactivo	Marca
Acetato de etilo	Sigma- Aldrich
Acido clorhídrico	Sigma- Aldrich
Acido hexanoico	Sigma- Aldrich
Carbonato de sodio	Sigma- Aldrich
Cloruro de oxalilo	Sigma- Aldrich
Cloruro de sodio	Sigma- Aldrich
Diclorometano	Sigma- Aldrich
Dimetilformamida	Sigma- Aldrich

Hexano	Sigma- Aldrich
Hidróxido de sodio	Sigma- Aldrich
Metanol	Química Delta
Metanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazolio	Fluka
Etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio	Fluka
n-tetradecano	Sigma- Aldrich
Sulfato de sodio	Sigma- Aldrich
Trietilamina	Sigma- Aldrich
4-nitrofenil acetato	Sigma- Aldrich
( <i>R</i> )-1-feniletanol	Fluka
( <i>R,S</i> )-1-feniletanol	Fluka

### 4.1.2 Instrumentos y equipos

Instrumento o equipo	Marca
Balanza analítica	
Columna capilar (30 m x 0.25 mm x 0.12 µm)	Astec CHIRALDEX <sup>TM</sup> B- DM

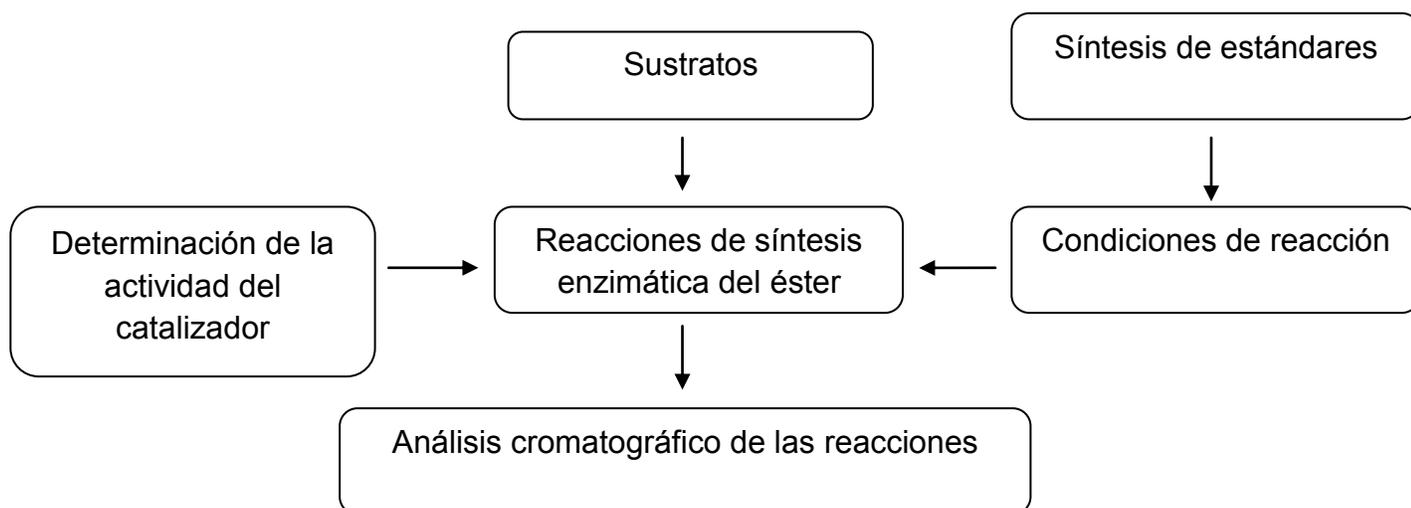
Cromatógrafo de gases 8610C equipado con FID	SRI Instruments
Espectrofotómetro CARY 400	Varian
Microcentrífuga refrigerada 5417R	Eppendorf
Micropipetas (5, 10, 20, 100, 200, 1000 µL)	Eppendorf/Gilson
Termomixer confort	Eppendorf
Vortex	

### 4.1.3 Enzimas

<b>Enzimas</b>
BplA inmovilizada en sílica gel
BplA-G28S inmovilizada en sílica gel
CalB (Novozym 435)

## 4.2 Desarrollo experimental

El desarrollo experimental general que se siguió se presenta en el diagrama de flujo que a continuación se muestra.



## 4.3 Métodos

### 4.3.1 Determinación de la actividad del catalizador

Para determinar la actividad de las lipasas inmovilizadas se utilizó su capacidad hidrolítica empleando un sustrato cromogénico, el 4-nitrofenil acetato.

#### Protocolo

1.- Para determinar la actividad de las lipasas, es necesario la elaboración de una curva patrón de 4-nitrofenol que se prepara bajo las mismas condiciones que las muestras a analizar. Las concentraciones utilizadas para establecer los puntos de la curva patrón fueron: 10, 30, 50 y 70  $\mu\text{M}$ . El cero se ajustó con una disolución amortiguadora de fosfatos 50 mM a pH 6.5 en que se disolvieron las muestras. La curva patrón se leyó a 410 nm en el espectrofotómetro.

2.- Preparar en tubos eppendorf las soluciones de la siguiente manera: 5 mg de cada una de las enzimas BpIA y BpIA-G28S previamente inmovilizadas en sílica gel (Benitez, 2009).

3.- Preparar una solución de 4-nitrofenil acetato 100  $\mu$ M en una disolución amortiguadora de fosfatos 50mM a pH 6.5.

3.- Añadir 1 mL de la solución de 4-nitrofenil acetato a los tubos eppendorf, para formar una solución.

4.- Agitar cada tubo en el vortex por 10 segundos e incubar las soluciones durante 2 minutos a 30°C.

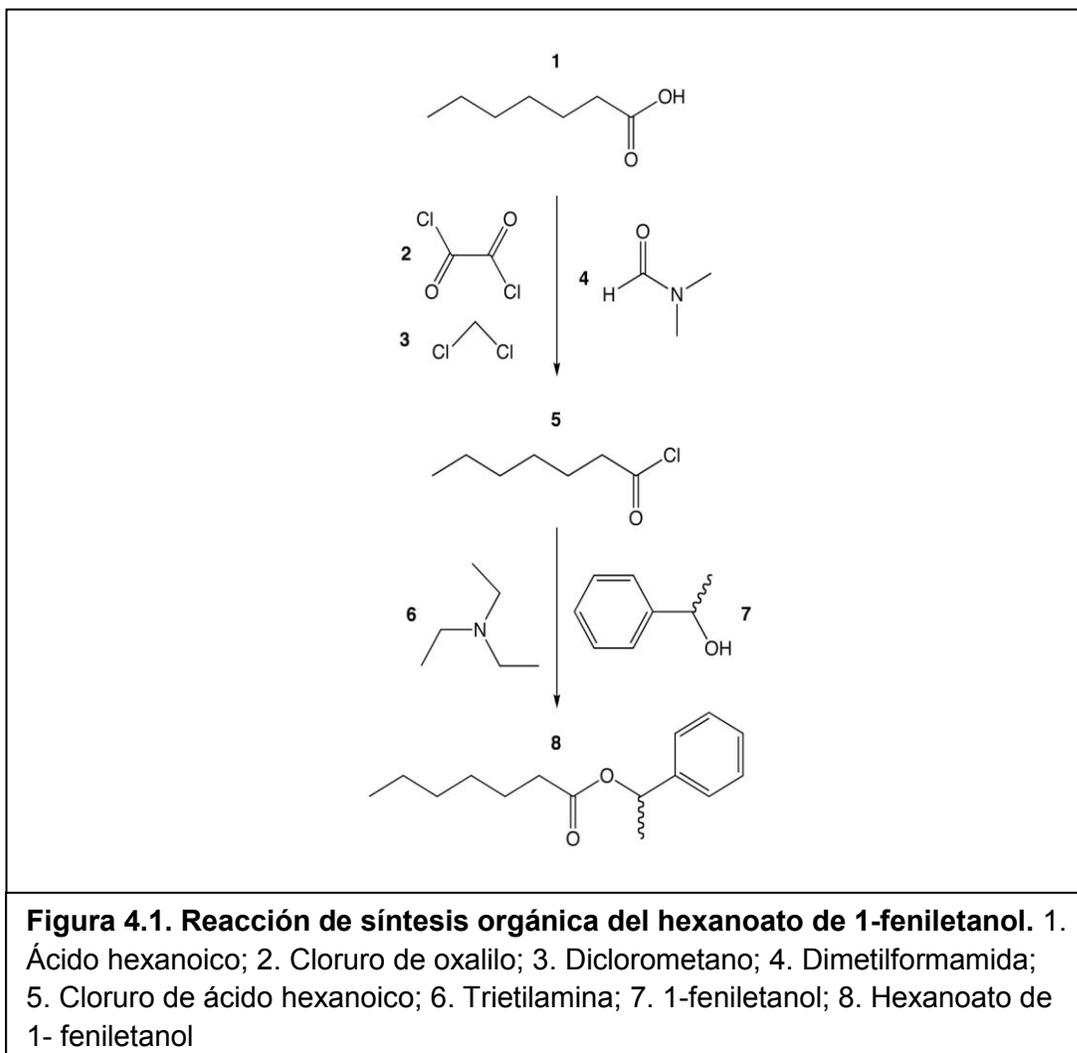
5.- Determinar la absorbancia que presentan cada una de las muestras a una longitud de onda de 410 nm en el espectrofotómetro CARY 400 (Varian).

6.- Con los datos obtenidos se construye la curva patrón y por interpolación se determina la concentración de 4-nitrofenol en las muestras y se calcula la actividad de las mismas asumiendo que la producción de 4-nitrofenol es lineal durante el tiempo de reacción.

### **4.3.2 Reacciones de síntesis de estándares**

Para tener un patrón de seguimiento de los posibles productos que se podrían obtener de las reacciones de esterificación, fue necesaria la elaboración de

reacciones de síntesis orgánica, a partir de compuestos conocidos, siguiendo el protocolo que se menciona a continuación.



#### Protocolo

- 1.- En un matraz Erlenmeyer de 50 mL con tapa de rosca, colocar 570  $\mu$ L de ácido hexanoico.
- 2.- Colocar el matraz en hielo y con agitación magnética, añadir 2520  $\mu$ L de cloruro de oxalilo.

- 3.- Agregar 7  $\mu\text{L}$  de dimetilformamida (DMF), que es utilizado como catalizador de la reacción.
- 4.- Continuar la agitación, hasta que termine de burbujear la reacción.
- 5.- Agregar 45.93 mL de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), previamente enfriado.
- 6.- Agregar 500  $\mu\text{L}$  de 1-feniletanol con agitación constante. Es importante mencionar que se llevaron a cabo 2 reacciones diferentes, en la primera reacción se utilizó el (*R*)-1-feniletanol y en la segunda reacción se utilizó el (*R,S*)-1-feniletanol.
- 7.- Agregar 960  $\mu\text{L}$  de trietilamina, esperar a que termine la reacción.
- 8.- Transvasar la solución a un embudo de separación y adicionar 50 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , agitar vigorosamente. Conservar la fase orgánica.
- 9.- Lavar con 150 mL de HCl. Conservar la fase orgánica.
- 10.- Lavar con 150 mL de una solución saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Conservar la fase orgánica.
- 11.- Lavar con 50 mL de una solución saturada de NaCl. Conservar la fase orgánica.
- 12.- Secar la fase orgánica con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro.

### 4.3.3 Reacciones de síntesis catalizadas por enzimas

Para estudiar la enantioselectividad de las lipasas BplA y BplA-G28S se realizaron reacciones de síntesis de 1-feniletil hexanoato a partir de ácido hexanoico y (*R,S*)-1-feniletanol. Para poder llevar a cabo las reacciones, fue necesario considerar las características que debían poseer para su posterior análisis por cromatografía de gases. Las condiciones analizadas fueron determinadas después de evaluar diversos ensayos en cambios de la temperatura de reacción, cambios en la concentración de la enzima, cambios en la concentración de sustrato, así como el tiempo de reacción. Como control positivo se utilizó la lipasa B de *Candida antarctica* (CalB), en su forma inmovilizada (Novozym 435). Se utilizaron como disolventes los líquidos iónicos metanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazolio ([Emim][CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]) o etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio ([Emim][EtSO<sub>4</sub>]).

Para llevar a cabo los ensayos se prepararon las reacciones por triplicado, según se muestra en la tabla 4.1 y siguiendo el protocolo que se menciona a continuación.

<b>Tabla 4.1. Condiciones de las reacciones de síntesis enzimática de 1-feniletíl hexanoato.</b>			
	Concentración de ácido hexanoico (mM)	Concentración de (R,S)-1- feniletanol (mM)	Concentración de líquido iónico (mM)
Reacción control negativo (sin enzima)	0.40	0.12	30.6
Reacción control positivo CalB	0.40	0.12	30.6
BplA	0.40	0.12	30.6
BplA-G28S	0.40	0.12	30.6

Es importante mencionar que cada una de las reacciones fueron preparadas por triplicado, utilizando 20 mg de catalizador de cada una de las enzimas, teniendo 10.6 U/g, 3.9 U/g, 9.2 U/g para CalB, BplA y BplA-G28S respectivamente. Dichas reacciones se analizaron a diferentes temperaturas para observar el comportamiento de las mismas, dichas temperaturas fueron: 15, 20, 25, 30, 35 y 40°C.

Protocolo
-----------

- 1.- Las muestras se prepararon considerando un volumen final de reacción de 500 µL que se llevaran a cabo en tubos eppendorf con capacidad de 1.5 mL.
- 2.- Adicionar a cada tubo eppendorf la cantidad de cada una de las especies involucradas según sea el caso, además de adicionar la lipasa de estudio. Colocar

una película plástica para sellar y cinta parafilm para evitar la pérdida de la mezcla de reacción por evaporación.

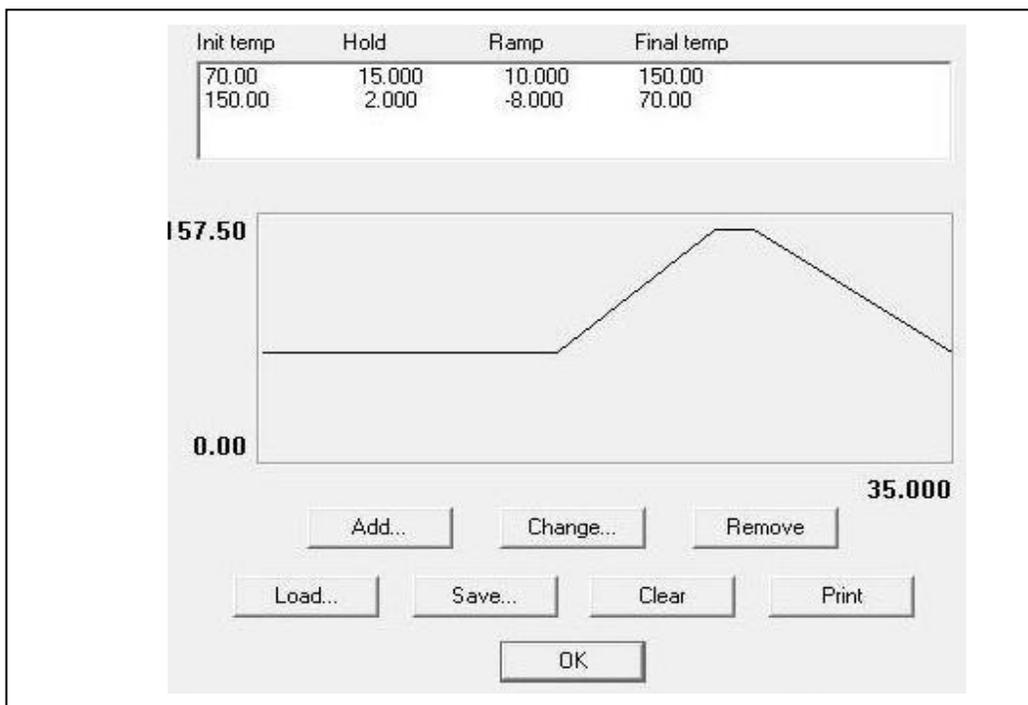
3.- Mezclar la disolución y las enzimas invirtiendo suavemente. Colocar los tubos eppendorf en el termomixer, programar el equipo a la temperatura del ensayo con agitación orbital de 500 r.p.m. por 72 horas.

#### **4.3.4 Análisis cromatográfico**

Para el análisis de las muestras que corresponden a las reacciones de síntesis se utilizó la técnica de cromatografía de gases. Con este fin se empleó un equipo con detector de ionización de flama (FID) acoplado a una computadora que cuenta con el programa *Peaksimple 3.85* y éste a su vez cuenta con un sistema inyector automático en modo Split (1:10). De esta manera para poder llevar a cabo el análisis cromatográfico de las muestras, se tuvo que realizar ensayos para determinar las condiciones de trabajo en donde se aplicaron variaciones en la tasa del gas acarreador y en la temperatura a la cual la columna capilar llevó a cabo la separación de los compuestos de interés.

Se utilizó hidrógeno como gas acarreador con un flujo de 14 mL por minuto y una columna capilar (Astec CHIRALDEX™ B-DM 30m x 0.25 mm x 0.12 µm) para efectuar la separación de los compuestos enantioméricos.

La temperatura de la columna se controló mediante una rampa de temperatura como se muestra en la Figura 4.2.



**Figura 4.2. Programa de temperatura para el análisis cromatográfico.** La temperatura del inyector se programó a 250°C, mientras que la temperatura de la columna se encuentra a 70°C, se mantiene la temperatura durante 15 min y posteriormente la temperatura es elevada a una velocidad de 10°C/min hasta 150°C. La columna se mantiene a esta temperatura por 2 minutos y finalmente la columna se enfría hasta 70°C a una velocidad de 8°C/min.

Para el análisis cromatográfico se empleó el siguiente protocolo:

Protocolo

- 1.- Transvasar cuantitativamente los medios de reacción a tubos eppendorf con capacidad para 1500  $\mu\text{L}$ .
- 2.- Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de acetato de etilo y agitar en el vortex por 45 segundos para efectuar la extracción de los compuestos orgánicos.

3.- Transferir la fase orgánica cuantitativamente en tubos eppendorf con capacidad de 500  $\mu\text{L}$  y centrifugar a 4500 r.p.m por 10 minutos. Conservar la fase orgánica en tubos eppendorf y a 15°C.

4.- Preparar una solución de estándar interno (1  $\mu\text{L}$  de *n*-tetradecano en 100  $\mu\text{L}$  de acetato de etilo)

5.- Preparar las muestras para el análisis de la siguiente manera: 15  $\mu\text{L}$  de fase orgánica + 10  $\mu\text{L}$  de estándar interno 0.01  $\mu\text{M}$  + 190  $\mu\text{L}$  de acetato de etilo.

6.- Las condiciones en las que se llevó a cabo el análisis cromatográfico fue el siguiente:

Volumen de inyección 200  $\mu\text{L}$

Flujo 14 mL/min

Cada uno de los lotes de muestras se prepararon por triplicado y después de 72 horas de incubación y seguidas del correspondiente proceso de extracción con acetato de etilo, se inyectaron por duplicado en el cromatógrafo de gases para su análisis.

#### **4.3.5 Análisis cuantitativo de las reacciones de síntesis**

Para el análisis cuantitativo de las reacciones de síntesis se efectuó el siguiente protocolo:

Protocolo
-----------

- 1.- Tomar 5  $\mu\text{L}$  del producto de reacción y transvasarlo a un tubo eppendorf con capacidad de 1500  $\mu\text{L}$
- 2.- Adicionar 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y agitar suavemente.
- 3.- Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  1M, mezclar la disolución invirtiendo el tubo eppendorf suavemente.
- 4.- Incubar el tubo de reacción a  $20^\circ\text{C}$  durante 12 hrs.
- 5.-Transvasar cuantitativamente los medios de reacción a un tubo eppendorf con capacidad para 1500  $\mu\text{L}$ .
- 6.- Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de acetato de etilo y agitar en el vortex por 45 segundos para efectuar la extracción.
- 7.- Transferir la fase orgánica cuantitativamente en tubos eppendorf con capacidad de 500  $\mu\text{L}$ .
- 8.- Preparar las muestras para el análisis de la siguiente manera: 15  $\mu\text{L}$  de fase orgánica + 10  $\mu\text{L}$  *n*- tetradecano utilizado como estándar interno  $0.01\mu\text{M}$  + 190  $\mu\text{L}$  de acetato de etilo.

El análisis cromatográfico se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

Volumen de inyección 200  $\mu\text{L}$

Flujo 14 mL/min

Para el análisis cuantitativo de las reacciones de síntesis se prepararon los tubos de reacción por triplicado y se inyectaron por duplicado en el cromatógrafo de gases para su análisis.

---

## Capítulo 5. Resultados y discusión

### 5.1 Determinación de la actividad de las lipasas

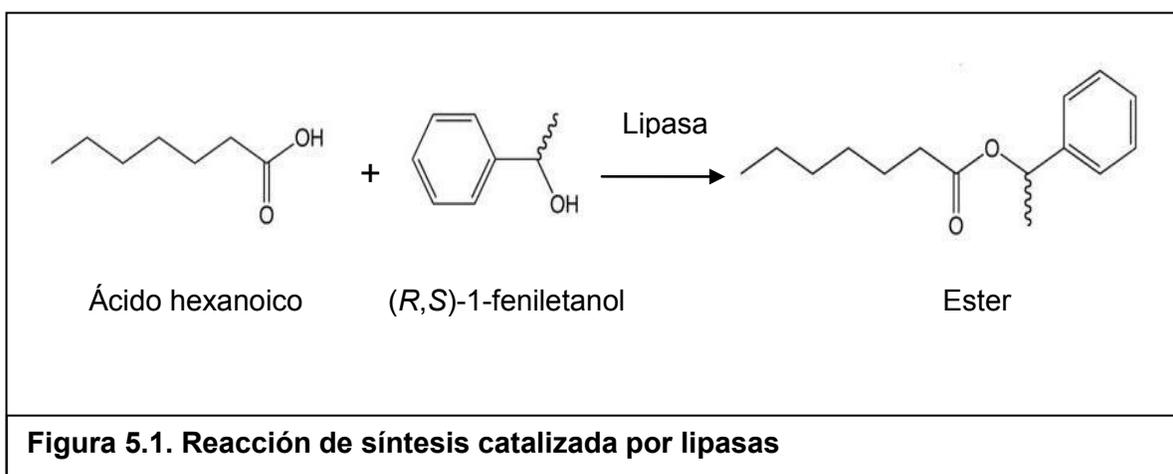
La actividad específica de las lipasas se determinó mediante la elaboración de una curva patrón. Dicha curva fue preparada a partir de soluciones a diferentes concentraciones de 4-nitrofenil acetato. Las muestras y curva patrón fueron incubadas bajo las mismas condiciones y de manera simultánea. La determinación espectrofotométrica se realizó a una longitud de onda de 410 nm. De esta manera se interpolaron los valores de la absorbancia que presentaron cada una de las muestras. En el capítulo 4, sección 3.1, se muestra detalladamente el protocolo del proceso, los resultados se muestran en la Tabla 5.1.

Lipasa	Actividad (U /g)
BpIA	3.9 ± 0.7
BpIA-G28S	9.2 ± 1.1
CalB	10.6 ± 1.0

## 5.2 Análisis cromatográfico de las reacciones

El estudio de la enantioselectividad que presentan las lipasas BpIA y BpIA-G28S, se sustentó en el análisis cromatográfico de las reacciones de síntesis del (*R,S*) éster, a partir de una ácido graso de cadena corta como lo es el ácido hexanoico.

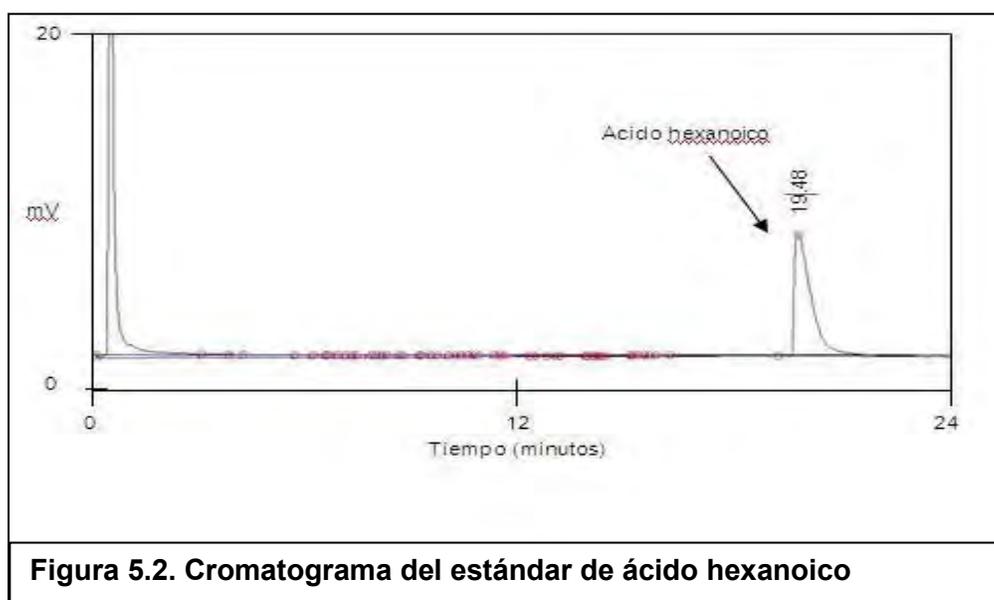
La reacción que se llevó a cabo se muestra en la Figura 5.1.



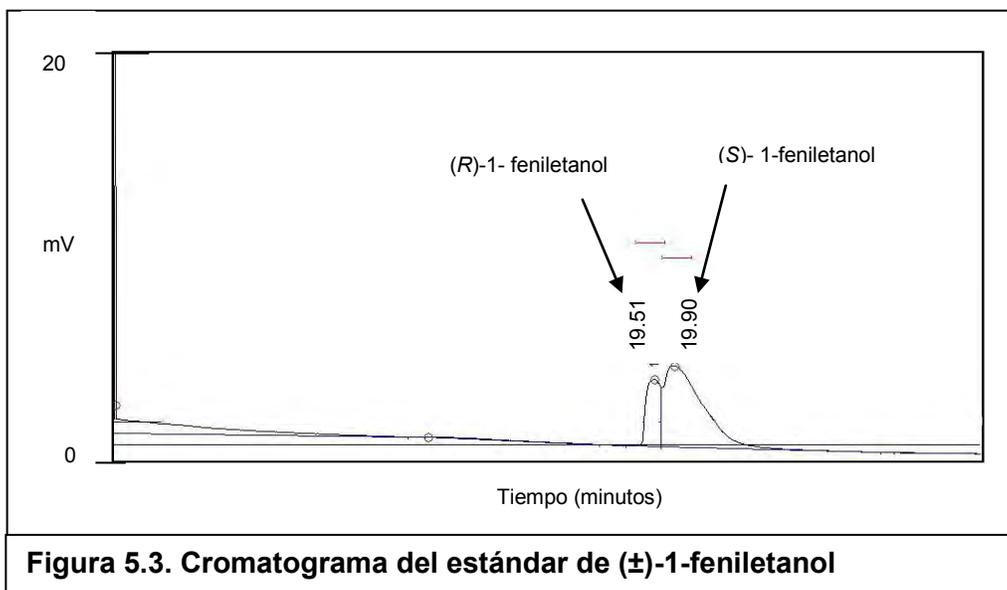
Este trabajo fue elaborado en diversas etapas: La primera etapa consistió en preparar los medios donde se llevaron a cabo las reacciones, esta etapa fue crucial en la elaboración del trabajo debido a las múltiples variantes que se tuvieron que tomar en cuenta para el diseño y preparación de las reacciones. Después de un exhaustivo análisis cualitativo de las condiciones de trabajo, donde se evaluó la concentración de sustrato, la cantidad de enzimas, temperatura y tiempos de reacción, se logró tener las condiciones definitivas para diseñar el medio y las condiciones de reacción, favoreciendo así la reproducibilidad de los ensayos.

La siguiente etapa del proceso consistió en la separación de los compuestos enantioméricos. Debido a que las propiedades físicas y químicas de los compuestos a separar son muy semejantes, el análisis de las muestras obtenidas se efectuó por cromatografía de gases en fase quiral. Las condiciones del análisis se describen en la Figura 4.2.

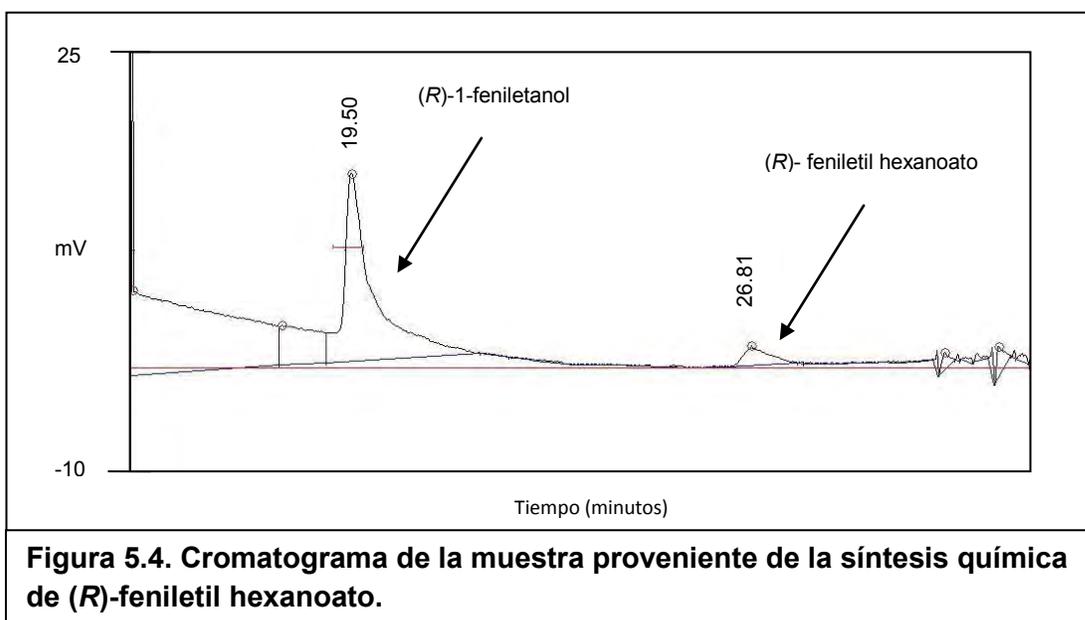
Para corroborar que los resultados obtenidos fueran los esperados se realizó un análisis cromatográfico, utilizando el programa de temperatura propuesto anteriormente, y se identificaron los tiempos de retención de cada uno de los componentes que intervienen en la reacción con la ayuda de una solución estándar de ácido hexanoico, (*R,S*)-1-feniletanol, (*R*)-feniletil hexanoato y (*R,S*)-1-feniletil hexanoato. En la Figura 5.2 se muestra el cromatograma de la solución estándar del ácido hexanoico ( $t_r = 19.48$  min). En la Figura 5.3 se muestra el análisis del (*R,S*)-1-feniletanol ( $t_r = 19.51$  min y  $t_r = 19.90$  min).



**Figura 5.2. Cromatograma del estándar de ácido hexanoico**

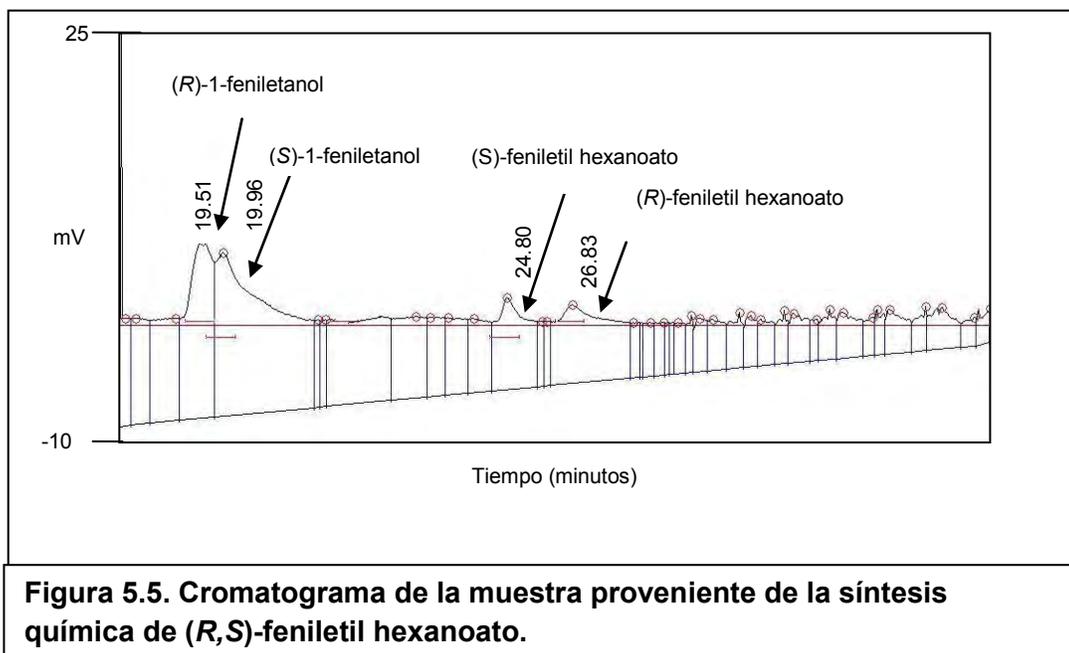


Una vez que se contó con el perfil cromatográfico de los reactivos que intervienen en la reacción, se llevó a cabo el análisis cromatográfico de los posibles productos y para cumplir dicho fin se inyectó la muestra obtenida de la reacción de síntesis química a partir de compuestos conocidos, utilizando como uno de los sustratos el (*R*)-1-feniletanol, de tal manera que esperábamos como producto de esta síntesis el (*R*)-feniletil hexanoato, como se muestra en la Figura 5.4.



**Figura 5.4. Cromatograma de la muestra proveniente de la síntesis química de (R)-feniletil hexanoato.**

De la misma manera se realizó el análisis cromatográfico de la muestra obtenida de la reacción de síntesis química a partir del ácido hexanoico y del (R,S)-1-feniletanol, este resultado se muestra en la Figura 5.5. Las primeras dos señales corresponden a la presencia de los dos enantiómeros del 1-feniletanol, el (R)-1-feniletanol y el (S)-1-feniletanol respectivamente ( $t_r = 19.51$  min y  $t_r = 19.96$  min). Mientras que los picos cuyos tiempos de retención son de 24.80 y 26.83 min corresponden al (S)-feniletil hexanoato y al (R)-feniletil hexanoato, respectivamente. Sabemos esto ya que la misma síntesis utilizando como sustrato al (R)-feniletanol nos mostró que el tiempo de retención de su éster de ácido hexanoico es de 26.81 min (Figura 5.4).



**Figura 5.5. Cromatograma de la muestra proveniente de la síntesis química de (R,S)-feniletil hexanoato.**

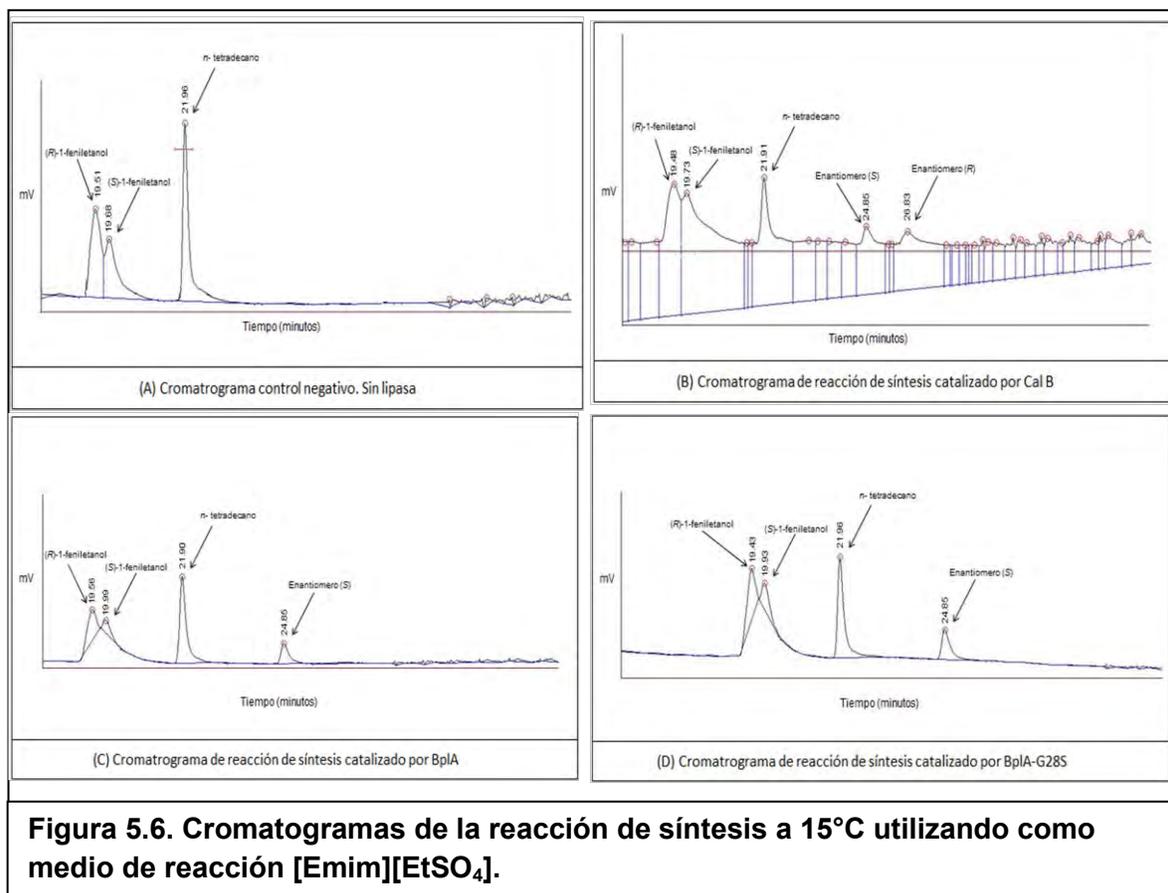
De esta manera, teniendo un patrón para analizar los resultados esperados, se analizaron los productos obtenidos a partir de las reacciones en cada una de las temperaturas propuestas para su análisis.

Es importante mencionar que con cada una de las temperaturas analizadas, además de estudiar el comportamiento de las lipasas BpIA y BpIA-G28S, se preparó una reacción que sirvió como control negativo, donde no se utilizó ninguna de las lipasas, y de la misma manera se montó una reacción, como control positivo, donde se utilizó la lipasa CalB (Novozym 435).

Las primeras muestras analizadas fueron las muestras obtenidas de las reacciones incubadas a 15°C durante 72 h, utilizando como medio de la reacción el [Emim][EtSO<sub>4</sub>]. En la Figura 5.6 se muestran los cromatogramas obtenidos a partir de las muestras obtenidas de la reacción a 15°C. El primer cromatograma (A) muestra la presencia de tres señales cromatográficas. Las primeras dos

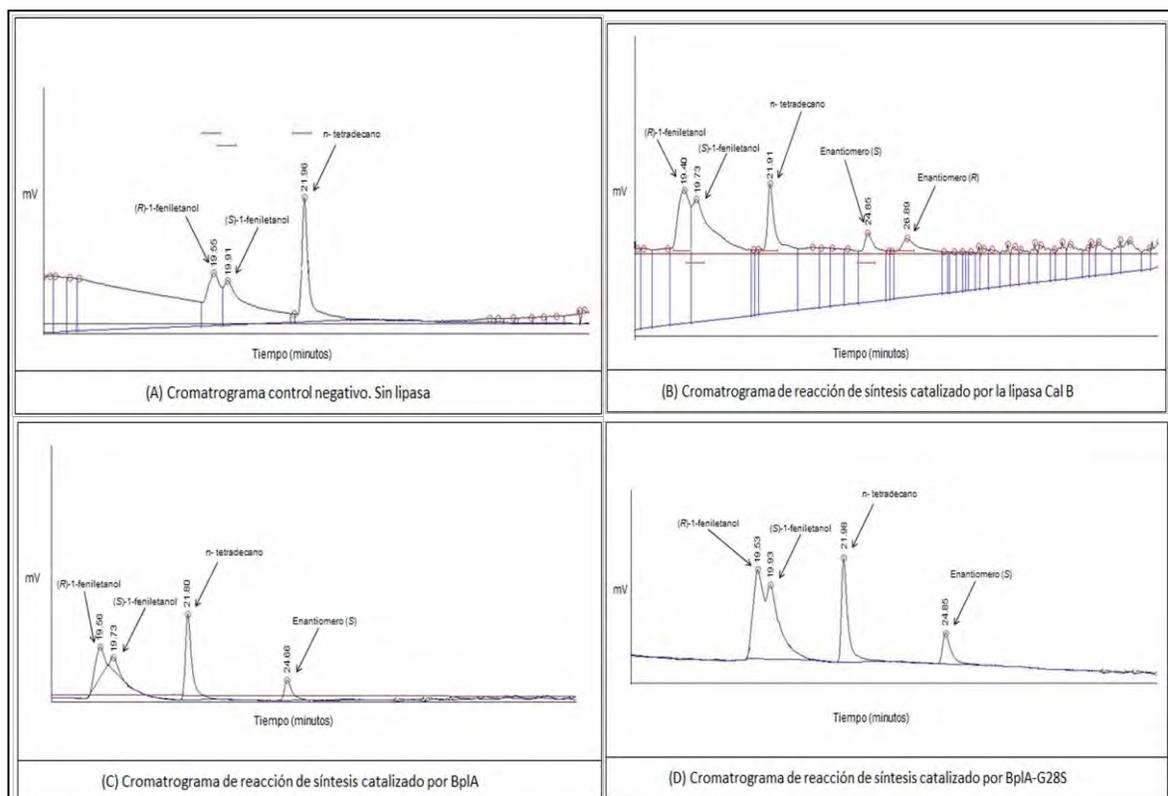
señales ( $t_r = 19.51$  min y  $t_r = 19.68$  min) corresponden a (*R*)-1-feniletanol y (*S*)-1-feniletanol, respectivamente, y la tercera señal ( $t_r = 21.96$ ) corresponde al estándar interno (*n*- tetradecano). Este resultado confirma que la reacción de síntesis, en ausencia de lipasa, no se lleva a cabo. El segundo cromatograma (B) corresponde a la reacción de síntesis utilizando la lipasa CalB y muestra la presencia de cinco señales cromatográficas, las primeras dos ( $t_r = 19.48$  min y  $t_r = 19.73$  min) corresponden al (*R*)-1-feniletanol y (*S*)-1-feniletanol respectivamente, el tercer pico cromatográfico ( $t_r = 21.96$  min) nuevamente indican la presencia del estándar interno; las últimas dos señales cromatográficas corresponden al producto de la reacción de síntesis del enantiómero *S* ( $t_r = 24.85$  min) y del enantiómero *R* ( $t_r = 26.83$  min). Este resultado nos confirma que la presencia de los productos de la reacción de síntesis se debe a la acción de la lipasa CalB y nos indica que la lipasa CalB no presenta una marcada enantioselectividad a 15°C en este disolvente. En el tercer cromatograma (C) se observan cuatro señales cromatográficas, las tres primeras nuevamente corresponden al (*R*)-1-feniletanol, al (*S*)-1-feniletanol y al *n*-tetradecano ( $t_r = 19.56$ , 19.99 y 21.90 min respectivamente), mientras que el último pico cromatográfico corresponde a la señal del producto de la reacción de síntesis del enantiómero *S* ( $t_r = 24.85$  min). Este resultado nos indica que la lipasa BpIA si es enantioselectiva a 15°C en este disolvente, aunque no se consumieron todos los sustratos, ni siquiera todo el alcohol *S*. En el cuarto y último cromatograma (D) se observan los mismos cuatro picos cromatográficos ( $t_r = 19.43$ , 19.93, 21.96 y 24.85 min, respectivamente) que corresponden a las mismas especies del cromatograma C, pero en esta ocasión

en presencia de la enzima BpIA-G28S, confirmando también que la lipasa BpIA-G28S es enantioselectiva en estas condiciones de reacción.



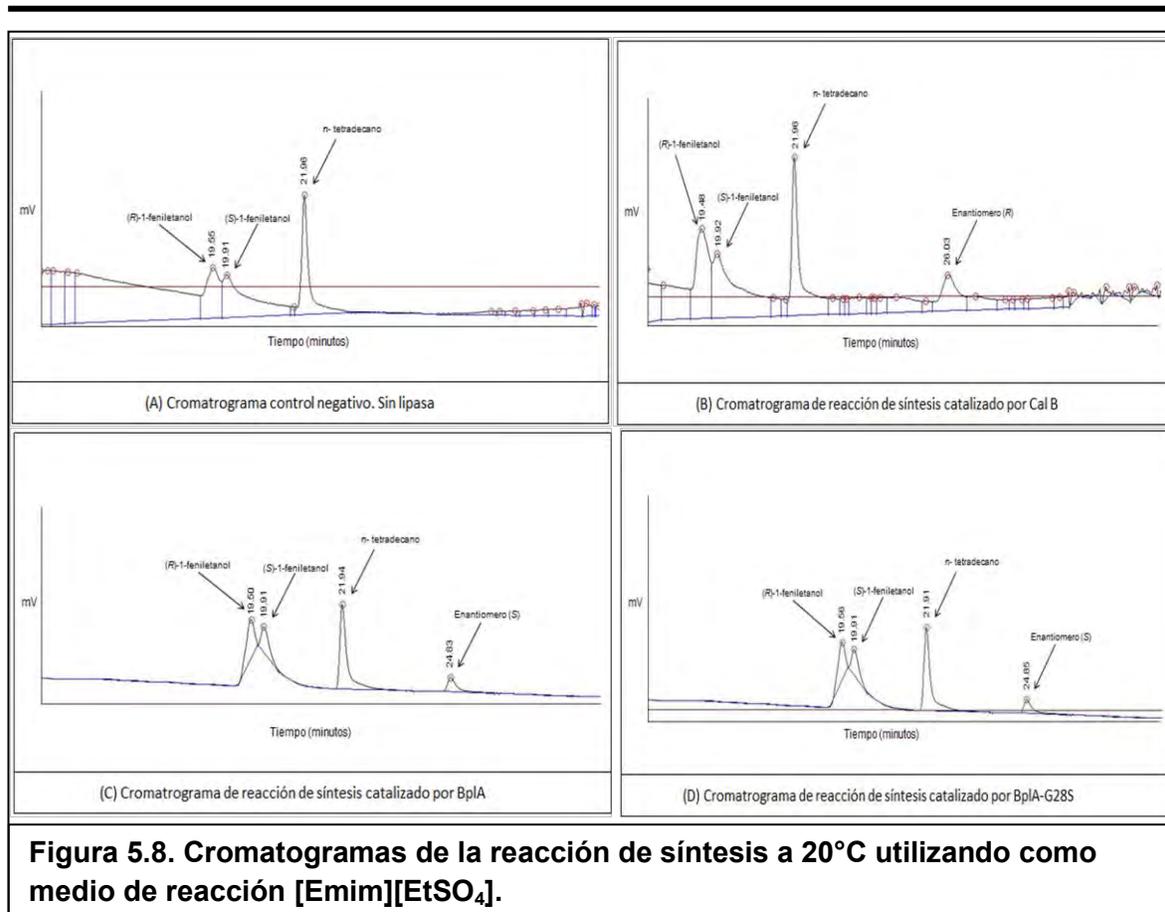
El segundo lote de muestras analizado (Figura 5.7), corresponde a las muestras que fueron obtenidas a partir de los medios de reacción donde ocurrieron los proceso de síntesis catalizados por las lipasas CalB, BpIA y BpIA-G28S, utilizando como medio de reacción el [Emim][CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>], incubadas a 15°C por un periodo de 72 horas. Se observa el mismo patrón de señales descrito en la Figura 5.5. Estos resultados nos confirman una vez más que las reacciones de síntesis catalizadas por las lipasas BpIA y BpIA-G28S muestran mayor enantioselectividad a 15°C,

esto sustentado en la formación preferente de un solo enantiómero, en comparación a la lipasa CalB que muestra la formación de los dos enantiómeros posibles.

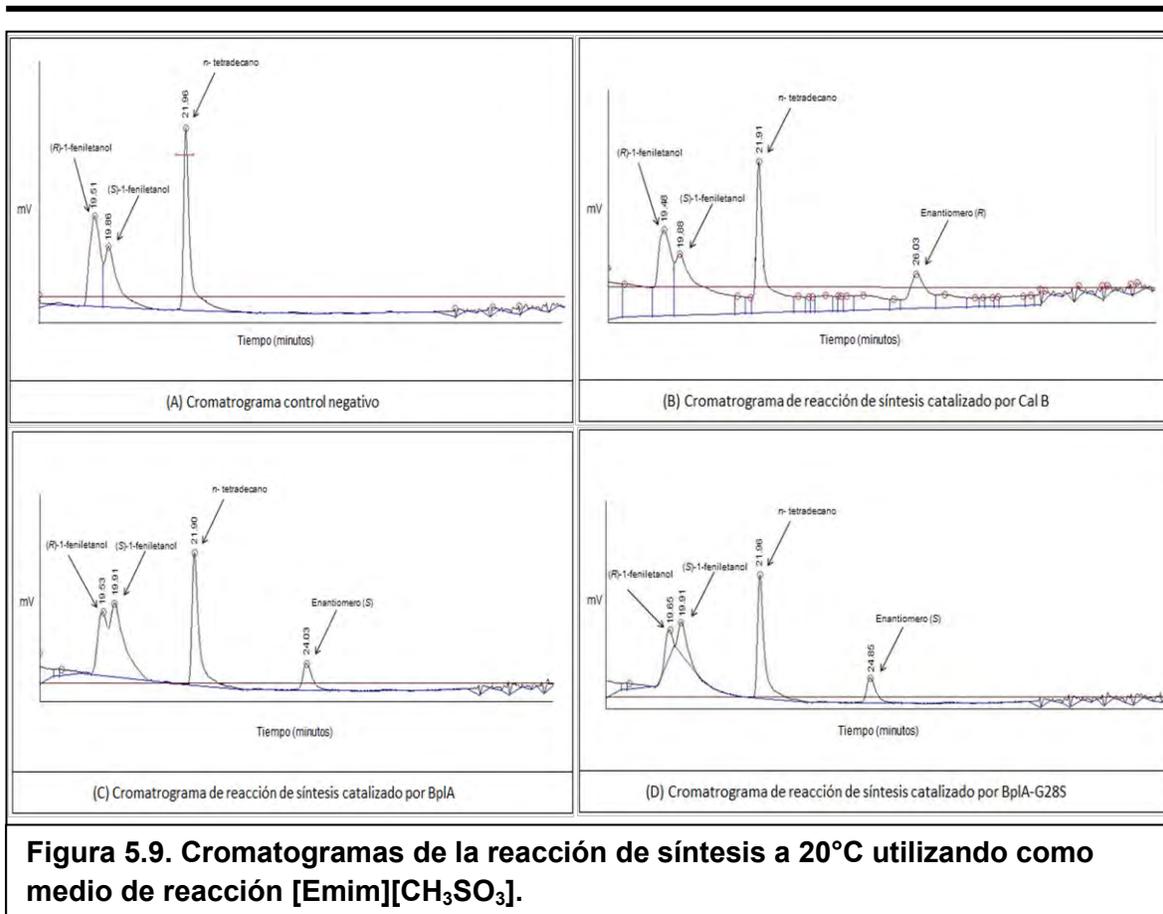


**Figura 5.7. Cromatogramas de la reacción de síntesis a 15°C utilizando como medio de reacción [Emim][CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>].**

El tercer lote de muestras analizado, corresponde a las muestras obtenidas de la reacción de síntesis catalizado por CalB, BplA y BplA-G28S incubadas a 20°C por un tiempo de 72 horas, utilizando como medio de reacción [Emim][EtSO<sub>4</sub>]. Los resultados fueron cualitativamente similares a los encontrados a 15°C, es decir, las enzimas BplA y BplA-G28S presentan una marcada enantioselectividad mientras que no es así para CalB (Figura 5.8).



El análisis de las muestras obtenidas a partir de los medios de reacción dónde se llevaron a cabo los procesos de síntesis catalizados por las lipasas CalB, BpIA y BpIA-G28S, incubados a 20°C durante un periodo de 72 horas y utilizando como medio de reacción el [Emim][CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>], arrojó también un resultado cualitativamente similar al visto a 15°C para las enzimas BpIA y BpIA-G28S (Figura 5.9). En contraste, la enzima CalB deja de presentar al enantiómero S del éster producto de la reacción de síntesis, y sólo conserva al enantiómero R. Estos resultados nos indican que CalB a 20°C en este disolvente es enantioselectiva y favorece la formación del enantiómero R.

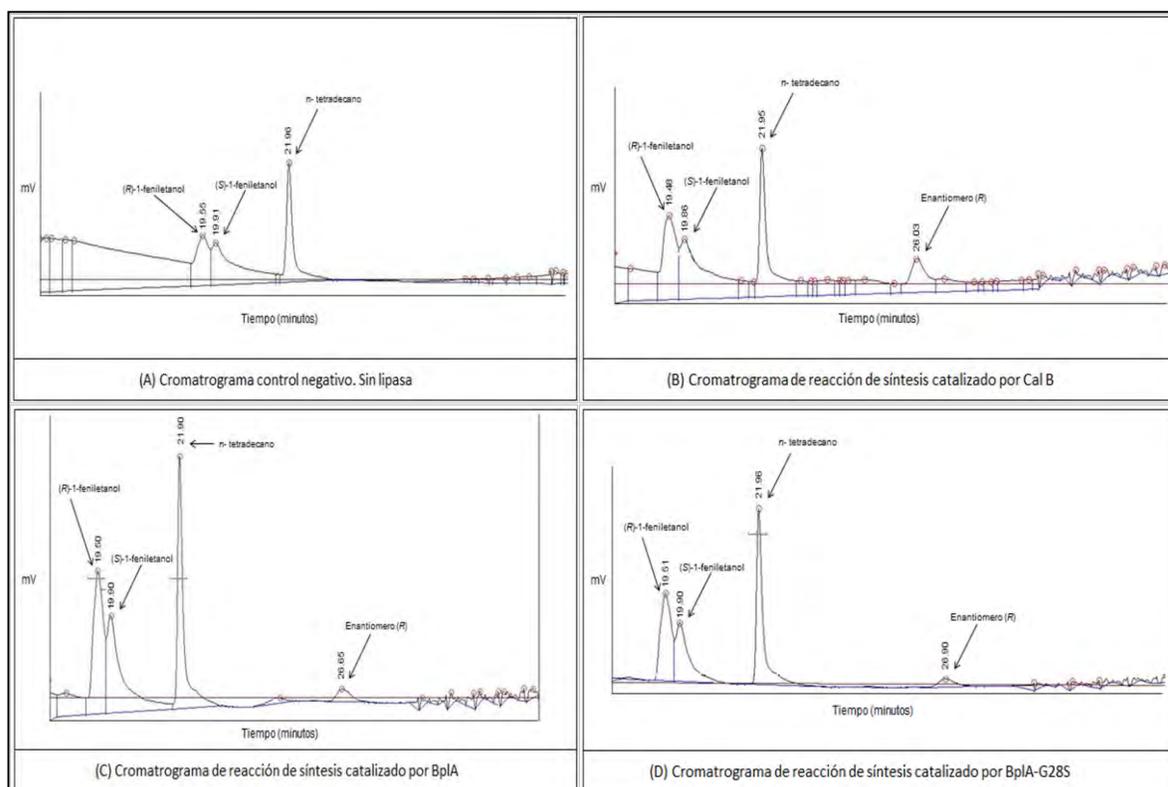


**Figura 5.9. Cromatogramas de la reacción de síntesis a 20°C utilizando como medio de reacción [Emim][CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>].**

Es importante mencionar que, como se pudo observar en las figuras anteriores, la reacción de síntesis a 20°C catalizada por la lipasa CalB, permite preferentemente la formación de uno de los enantiómeros, en este caso la lipasa CalB se caracteriza por la preferencia hacia el enantiómero *R*; por el contrario, las reacciones de síntesis incubadas a 20°C y catalizadas por las lipasas BpIA y BpIA-G28S se inclinan también por la formación de sólo uno de los enantiómeros posibles, en este caso el enantiómero *S*.

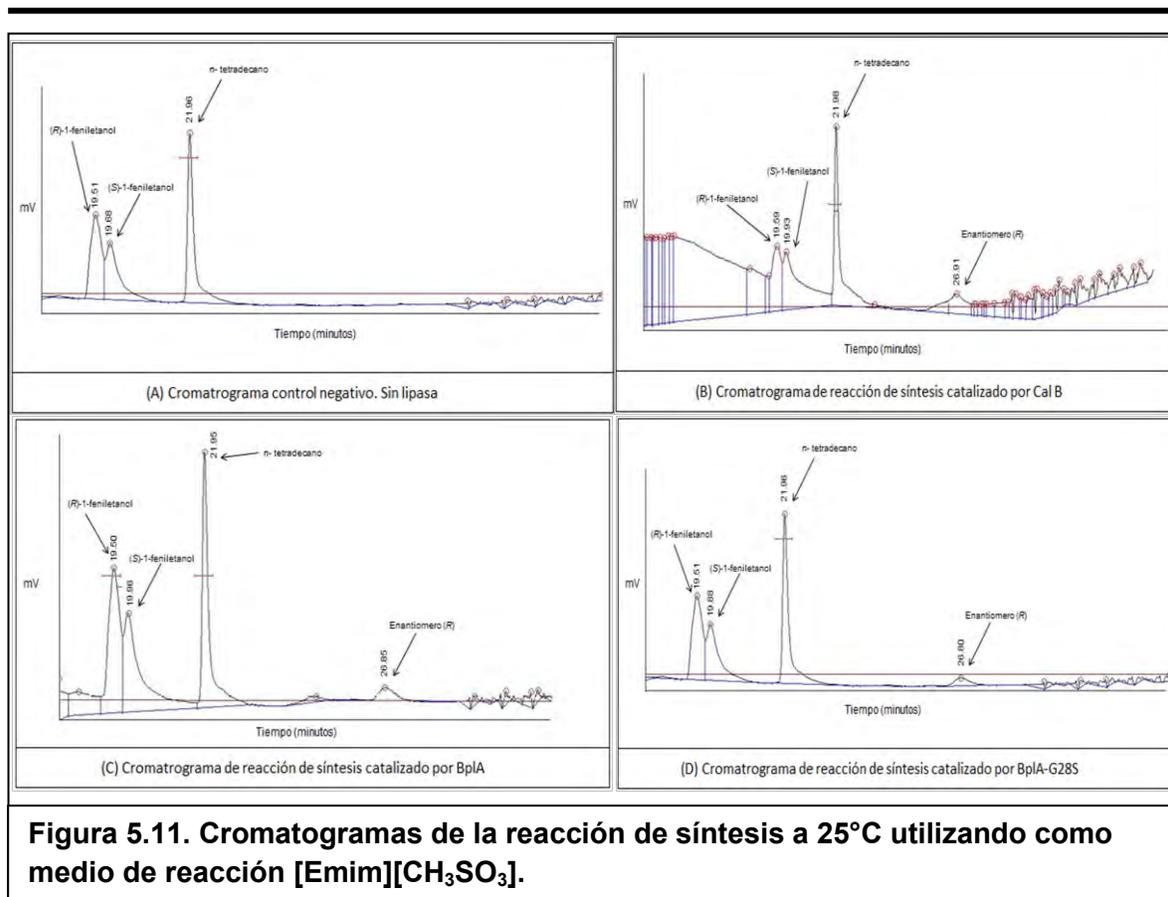
Al aumentar la temperatura de reacción a 25°C en [Emim][EtSO<sub>4</sub>] como disolvente observamos que el comportamiento del control y de la enzima CalB siguieron el mismo patrón observado a 20°C (Figura 5.10), es decir, CalB sigue presentando

preferencia por el enantiómero *R* del alcohol. En el caso de las enzimas BpIA y BpIA-G28S encontramos una reacción apenas detectable, en la que, al contrario de lo observado a otras temperaturas, sólo aparecía el enantiómero *R* del éster. Esto implica que el cambio de temperatura estaría invirtiendo la enantioselectividad de las lipasas de *B. pumilus* al aumentar la temperatura.



**Figura 5.10. Cromatogramas de la reacción de síntesis a 25°C utilizando como medio de reacción [Emim][EtSO<sub>4</sub>].**

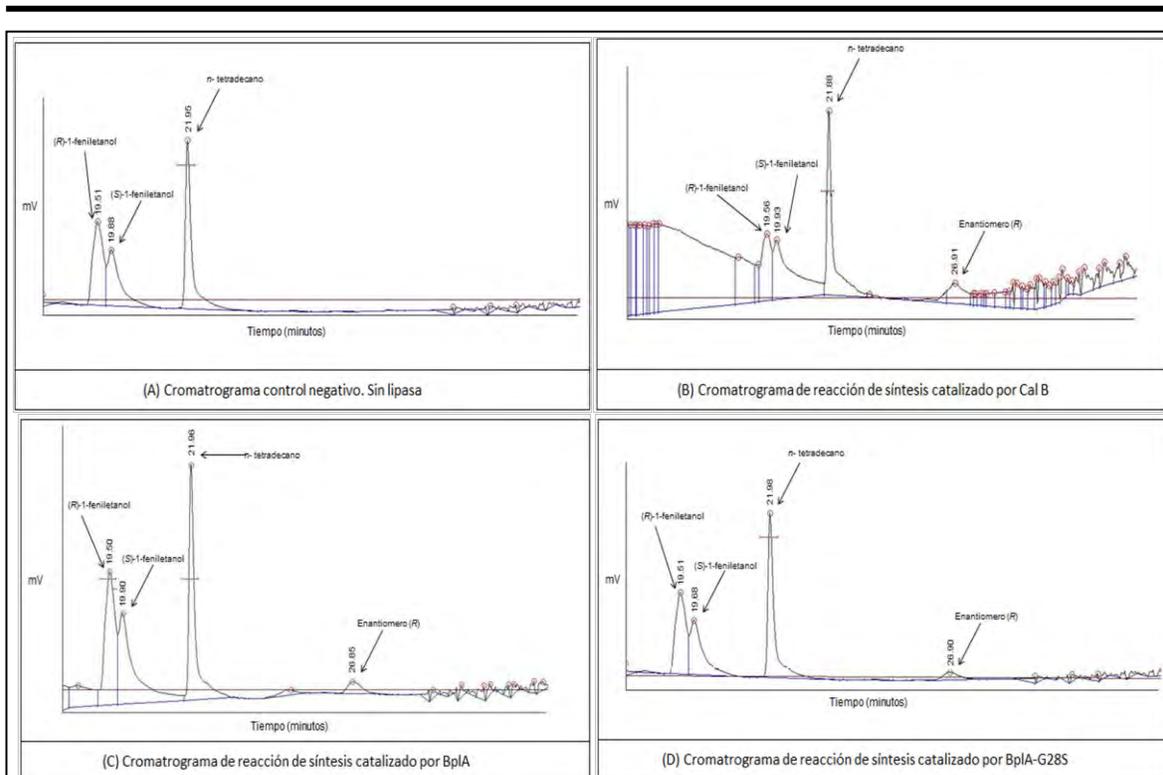
Lo anterior fue corroborado por la reacción realizada a 25°C, durante 72 horas, utilizando [Emim][CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>] como medio de reacción (Figura 5.11). Nuevamente se observa que las lipasas de *B. pumilus* dejaron de producir el éster *S* para producir sólo el éster *R*.



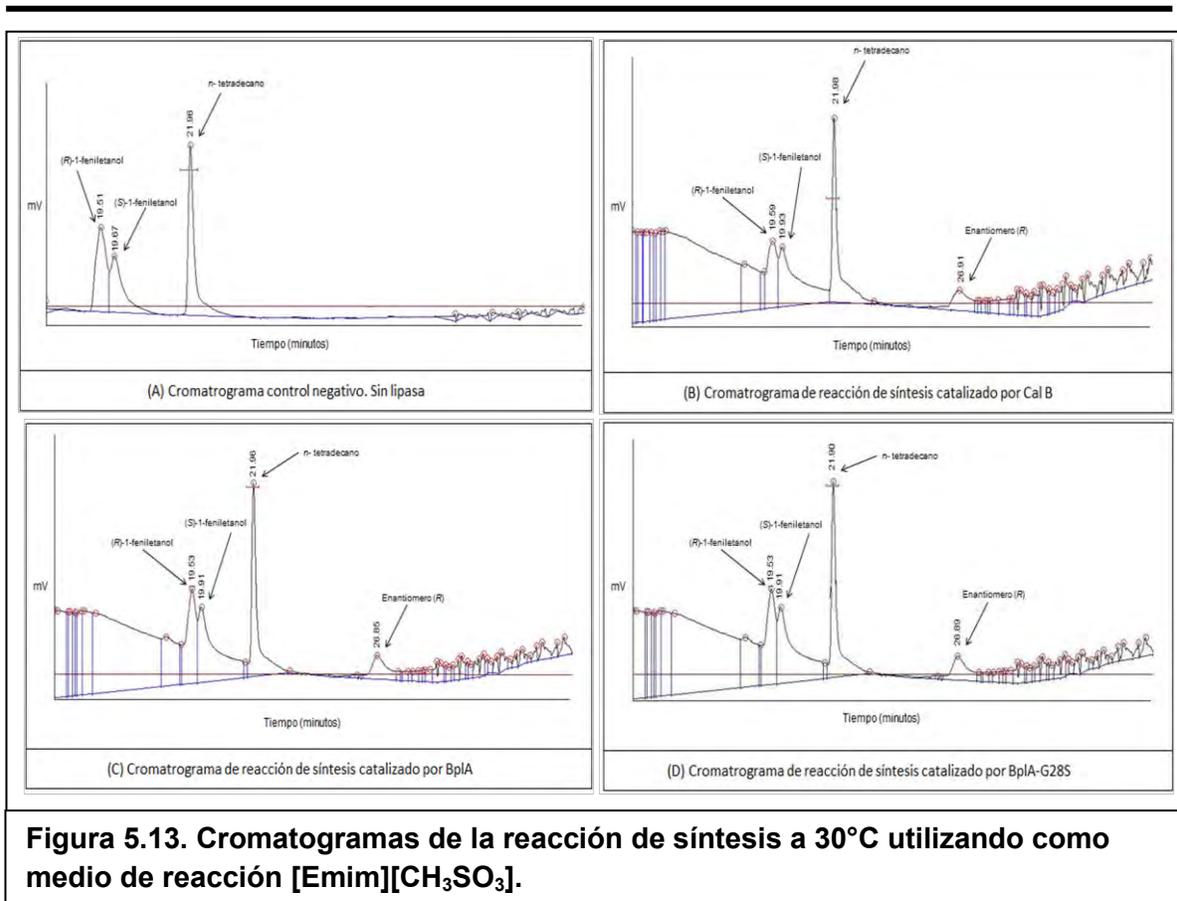
**Figura 5.11. Cromatogramas de la reacción de síntesis a 25°C utilizando como medio de reacción [Emim][CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>].**

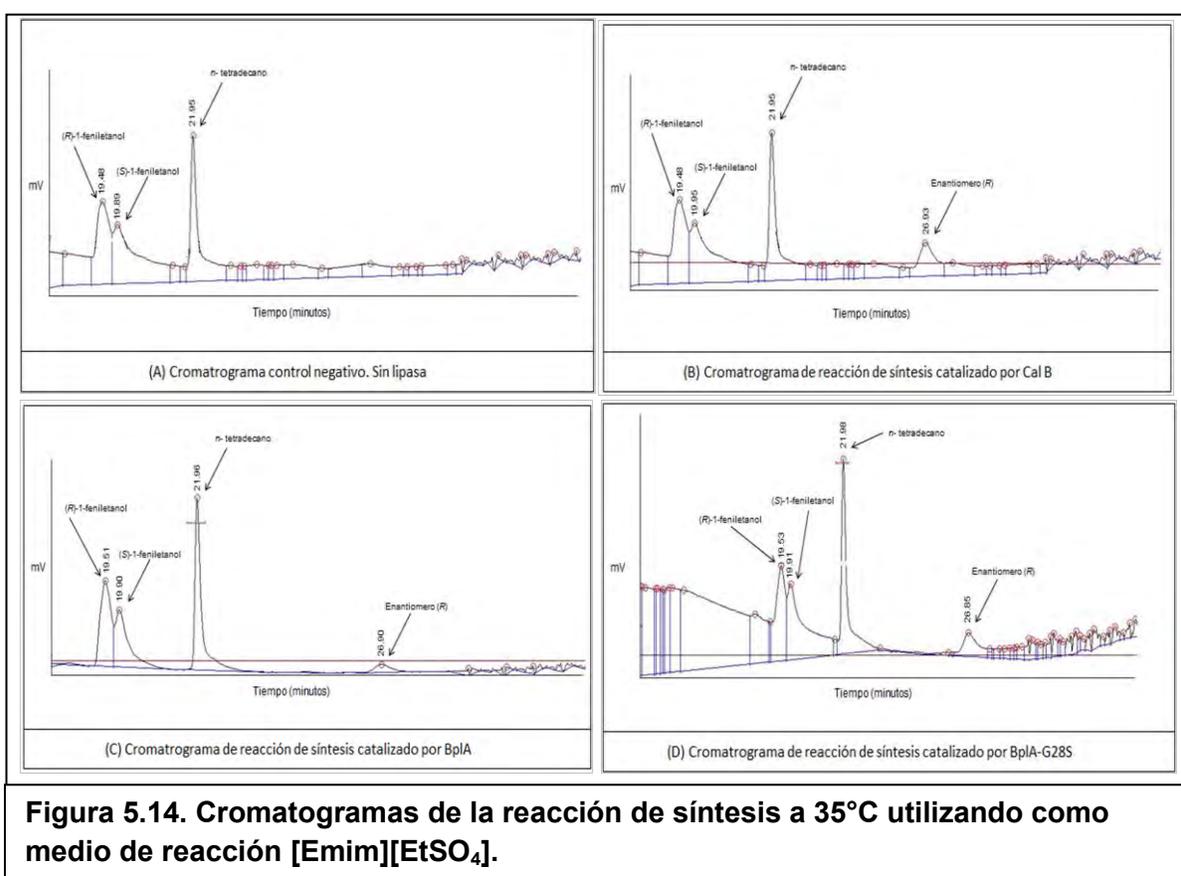
En las mismas condiciones se montaron seis lotes más de reacciones, donde las variantes de los sistemas solo fue el medio de reacción y la temperatura a la que fueron incubadas.

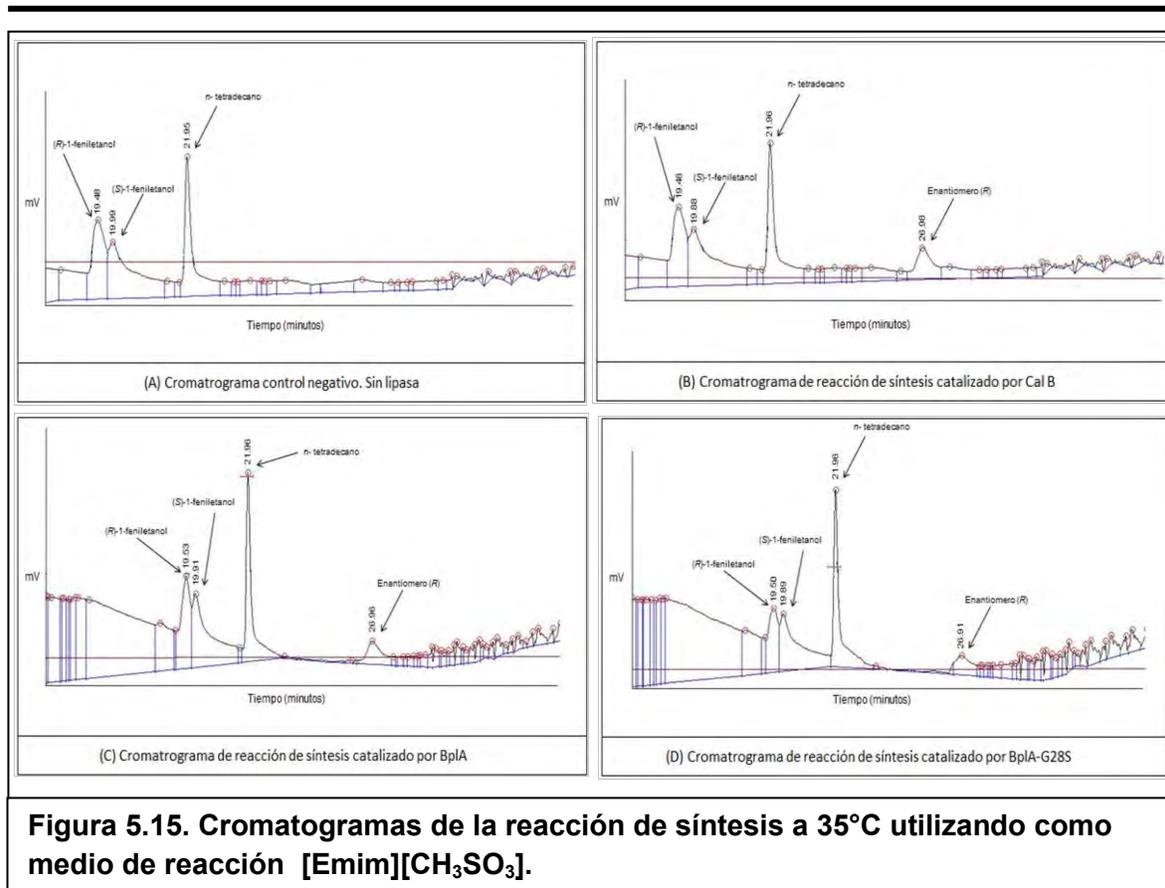
Al aumentar la temperatura a 30 o 35°C, independientemente del LI usado, se siguió observando la misma tendencia: la enzima CalB siguió siendo enantioselectiva en favor del enantiómero R, al igual que las lipasas de *B. pumilus* (Figuras 5.12, 5.13, 5.14 y 5.15). La única diferencia notoria fue el aumento del área de las señales correspondientes al (R)-1-feniletal hexanoato al aumentar la temperatura en las reacciones catalizadas por las enzimas BplA y BplA-G28S.



**Figura 5.12. Cromatogramas de la reacción de síntesis a 30°C utilizando como medio de reacción [Emim][EtSO<sub>4</sub>].**







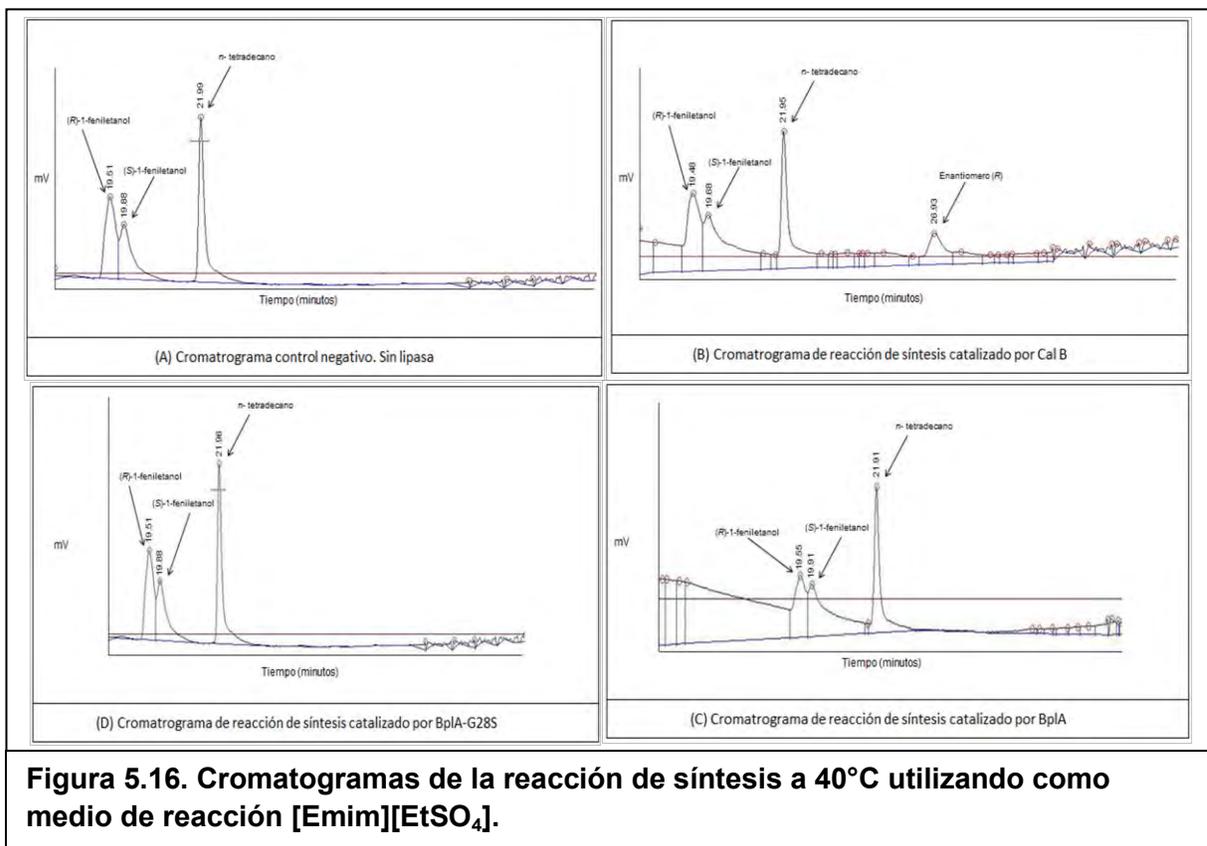
**Figura 5.15. Cromatogramas de la reacción de síntesis a 35°C utilizando como medio de reacción [Emim][CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>].**

Los cromatogramas confirman que los productos obtenidos a partir de las reacciones de síntesis catalizadas que las lipasas CalB, BpIA y BpIA-G28S prefieren la formación del enantiómero (*R*), indicándonos que a temperatura de 35°C e indistintamente en el medio de reacción donde se lleven a cabo las reacciones, se comportan de manera semejante.

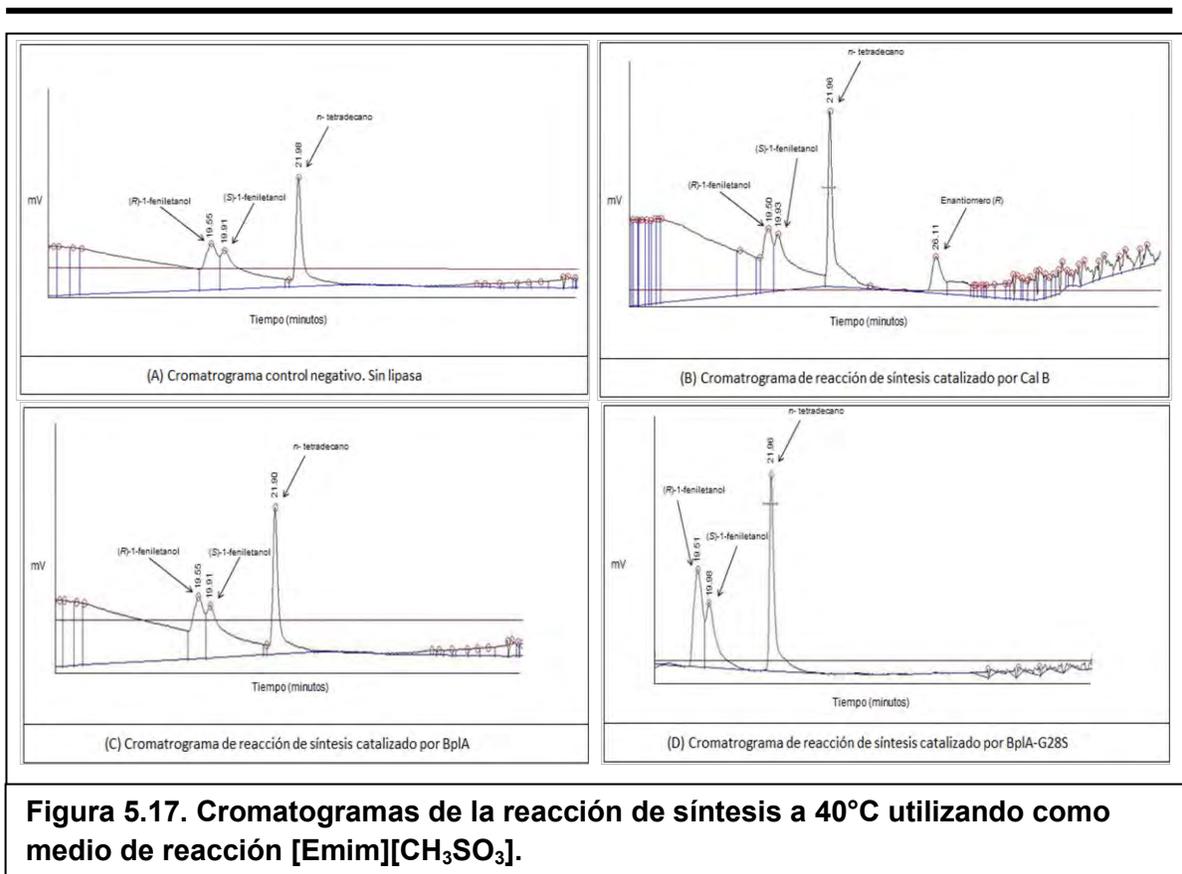
De manera que se obtuvieron resultados semejantes en cuanto a la enantioselectividad que presentaron las lipasas, se decidió seguir aumentando la temperatura y es por ello que se realizaron ensayos a 40°C.

En la Figura 5.16 se muestran los cromatogramas de las reacciones de síntesis catalizadas por CalB, BpIA y BpIA-G28S utilizando el [Emim][EtSO<sub>4</sub>] como medio

de reacción. Se observa claramente que mientras CalB mantiene su actividad y enantioselectividad, BpIA y BpIA-G28S no presentaron productos. Lo mismo se observó en el LI [Emim][CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>] (Figura 5.17).



**Figura 5.16. Cromatogramas de la reacción de síntesis a 40°C utilizando como medio de reacción [Emim][EtSO<sub>4</sub>].**



**Figura 5.17. Cromatogramas de la reacción de síntesis a 40°C utilizando como medio de reacción [Emim][CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>].**

Los resultados de este ensayo nos muestran que la reacción de síntesis no se lleva a cabo, es decir, que a 40°C las lipasas BplA y BplA-G28S no son activas bajo estas condiciones, por lo que no podemos observar en el cromatograma una señal que garantice que se llevó a cabo la reacción. Cabe mencionar que es el mismo resultado utilizando el [Emim][EtSO<sub>4</sub>] y [Emim][CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>], lo que nos indica, en este caso, que la naturaleza del medio no es la que afecta en la obtención de estos resultados, sino que se debe a las características específicas de las lipasas BplA y BplA-G28S.

La inversión de la enantioselectividad de una reacción catalizada mediante la modificación de la temperatura ha sido observada en diversos sistemas. A este

hecho se le conoce como "isoinversión" y a la temperatura en la que cambia la enantioselectividad de le llama "temperatura racémica" (Gianfranco y col., 2000). La "relación enantiomérica" o "valor  $E$ " es la relación de la concentración de los enantiómeros (Ecuación 1) (Phillips, 1996).

$$E = \frac{[R]}{[S]} = \frac{k_{catR} / K_{mR}}{k_{catS} / K_{mS}} \quad (1)$$

Durante el desarrollo de la reacción, el valor de  $E$  está relacionado con la diferencia en la energía libre de activación ( $\Delta\Delta G^\ddagger$ ) de las vías catalíticas de cada enantiómero:

$$\Delta\Delta G^\ddagger = -RT \ln E \quad (2)$$

$\Delta G^\ddagger$  puede ser expresado en términos de los parámetros de Eyring como se muestra en la Ecuación 3.

$$\Delta\Delta G^\ddagger = \Delta\Delta H^\ddagger - T\Delta\Delta S^\ddagger \quad (3)$$

En el caso en que no existe discriminación por alguno de los enantiómeros, el valor de  $\Delta\Delta G^\ddagger = 0$ . En este caso las contribuciones de la entropía y la entalpía son iguales.

$$\Delta\Delta H^\ddagger = T\Delta\Delta S^\ddagger \quad (4)$$

El rearrreglo de la Ecuación 4 define una temperatura en la que no existe discriminación por alguno de los enantiómeros, la temperatura racémica o  $T_r$ :

---

$$T_r = \Delta\Delta H^\ddagger / \Delta\Delta S^\ddagger \quad (5)$$

La ecuación 5 predice que por abajo de la  $T_r$ ,  $\Delta\Delta G^\ddagger$  es dominado por  $\Delta\Delta H^\ddagger$  y el valor de  $E$  disminuirá al ir aumentando la temperatura hasta alcanzar un valor de 1 al llegar a  $T_r$ . En contraste, por arriba de  $T_r$ ,  $\Delta\Delta G^\ddagger$  será dominado por  $T\Delta\Delta S^\ddagger$  y el valor de  $E$  aumentará al aumentar la temperatura. De este modo, la pureza enantiomérica de una reacción catalizada por enzimas puede ser modulada modificando la temperatura. Esta situación, sin embargo, no es comúnmente observada, ya que el intervalo de temperaturas en el que las enzimas conservan su actividad es relativamente pequeño comparado con lo que podría ser requerido. En nuestro caso, las lipasas de *B. pumilus* mostraron este comportamiento en los LI usados. La isoinversión para estas mismas enzimas no se ha observado en medio acuoso, para la hidrólisis, ni en hexano, en la misma síntesis. En el caso de la enzima CalB, ésta disminuyó su valor de  $E$  a bajas temperaturas y lo aumentó significativamente al aumentar la temperatura. En contraste, las enzimas de *B. pumilus* no disminuyen o aumentan su valor de  $E$ , ya que en ningún caso se logró detectar a los dos productos enantioméricos en la misma reacción. De acuerdo a la Ecuación 1, el valor de  $E$  para estas enzimas transita de 0, a bajas temperaturas, a infinito, al aumentar la temperatura. Es posible que nuestros métodos analíticos no nos permitan ver la presencia de los dos productos y que la  $T_r$  realmente no fue ensayada y se encuentre entre 20 y 25°C. Sin embargo es claro que la isoinversión en BplA y BplA-G28S es muy marcada.

Para todas las enzimas usadas, la conversión de sustrato a producto no fue completa, como se observa en los cromatogramas correspondientes. Por supuesto que tiempos mayores de incubación no mejoraron el rendimiento de nuestras reacciones. Esto sugiere que la enzima se está inactivando o que se alcanzó el equilibrio. En el medio de reacción se produce agua durante la síntesis del éster. Es factible que esta misma agua sea usada por la lipasa para hidrolizar al producto formado. En ensayos previos se incluyó malla molecular en las reacciones para atrapar el agua formada. Sin embargo en los controles y en las reacciones catalizadas por lipasa, tanto los sustratos como los productos no pudieron ser detectados en cromatografía de gases. Aparentemente la gran polaridad de los LI hizo que incluso los sustratos fueran atrapados por la malla molecular, evitando así la extracción y seguramente también la reacción. Finalmente las reacciones se realizaron en ausencia de malla molecular y, en consecuencia, el agua formada no se pudo eliminar de la mezcla de reacción. En este punto no podemos saber cuál es la causa real de la baja conversión observada.

De manera global, es posible decir que las enzimas inmovilizadas, en un medio de reacción polar y limitado en la cantidad de agua, realizan la reacción de síntesis. Por esta razón se decidió estudiar cuantitativamente las reacciones en condiciones de temperatura y disolventes que permitieran la producción de los compuestos de interés.

### 5.3 Análisis cuantitativo de las reacciones de síntesis

Al no contar con estándares de cualquiera de los enantiómeros del 1-feniletil hexanoato, fue necesario estimar la concentración de éste mediante un método indirecto. El método se basa en la extracción del éster, su hidrólisis en condiciones alcalinas y la cuantificación del alcohol producido, como se describe en la sección 4.3.5. Se elaboró una curva patrón del (*R,S*)-1-feniletanol, por cromatografía de gases bajo el programa de temperaturas especificado en el capítulo 4 de materiales y métodos.

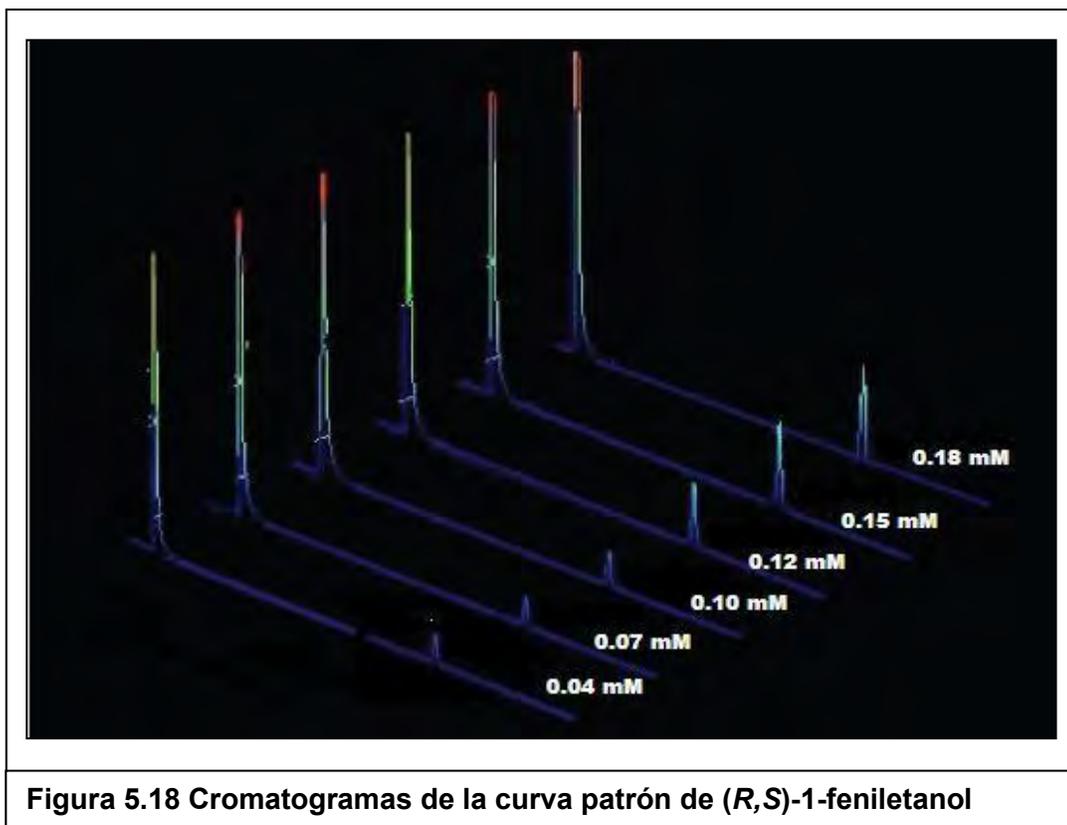
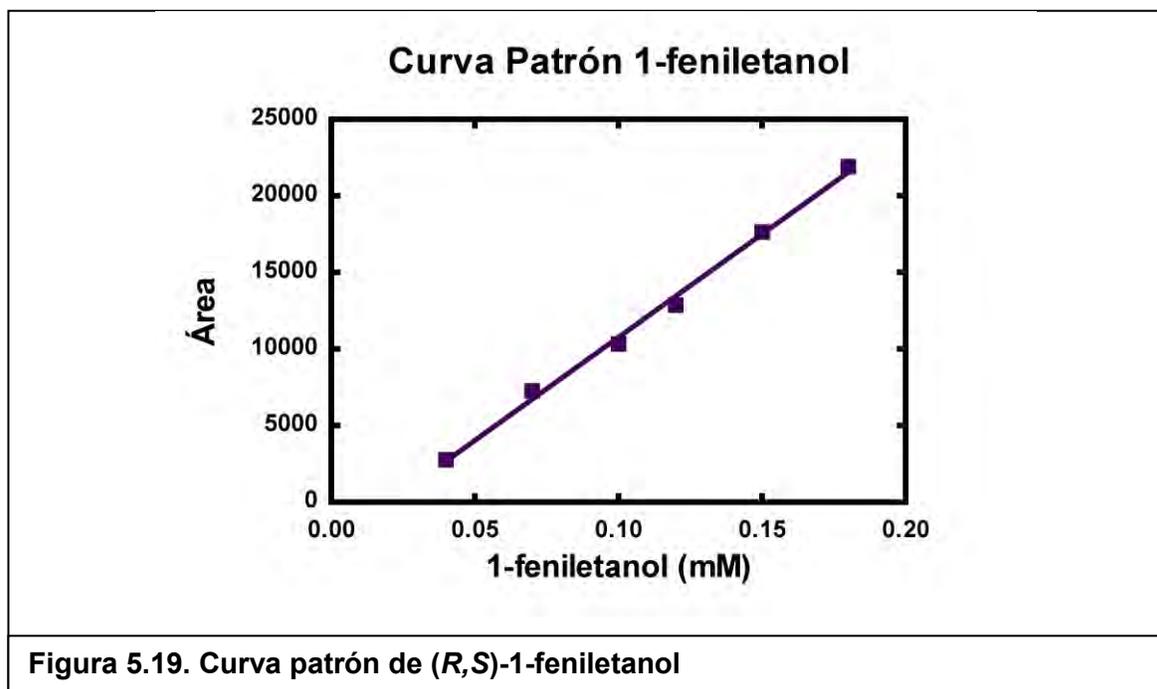


Figura 5.18 Cromatogramas de la curva patrón de (*R,S*)-1-feniletanol

Fue observada una relación directamente proporcional entre la concentración de alcohol y el área de cada uno de los picos (Figura 5.18). Los datos fueron ajustados a una línea recta para poder interpolar datos de las muestras (Figura 5.19).



El coeficiente de correlación obtenido ( $R^2=0.9958$ ) es un valor aceptable que nos permite asegurar que los resultados obtenidos a partir de la ecuación de la recta serán cercanos al valor real. En esta ecuación se interpolaron los datos resultantes de cada una de las muestras para obtener la concentración de alcohol. Una vez teniendo el producto de la reacción de síntesis y la curva patrón elaborada, se les adicionó a las muestras un exceso de hidróxido de sodio, a temperatura ambiente, de manera tal, que al estar en contacto el producto de la reacción con el medio alcalino, se hidroliza el éster para liberar el alcohol.

Posteriormente se hizo una extracción con acetato de etilo en la que el ácido hexanoico no es recuperado debido a la alcalinidad del medio. El acetato de etilo recuperado es usado para inyectar en el cromatógrafo de gases, observando solamente la señal de los enantiómeros del 1-feniletanol. Estos datos se interpolaron en la curva patrón de este alcohol.

Santillán (2012), desarrolló un trabajo en el que se llevó a cabo el análisis cromatográfico de las reacciones de hidrólisis del (*R,S*)-1-feniletil acetato, donde se obtuvo como producto de la reacción (*R,S*)-1-feniletanol. En este trabajo se utilizó al 1-feniletanol como analito por lo que requirió establecer la proporción de cada uno de sus enantiómeros en la mezcla racémica comercial que usó como estándar. Los resultados mostraron la presencia de un 53% del enantiómero (*R*) y un 47% del enantiómero (*S*), de manera que en el presente trabajo se consideró que la cantidad de sustrato presente en cada una de las reacciones de síntesis obedeció a dicha proporción, ya que se usó exactamente el mismo racemato como sustrato de nuestra reacción. Los resultados del progreso de las reacciones catalizadas por las lipasas de *B. pumilus* y CalB, se muestran en las Tablas 5.2, 5.3 y 5.4. Los datos de la concentración de producto en función de la temperatura se encuentran en las Figuras 5.20, 5.21 y 5.22.

Tabla 5.2. Resultados del análisis cuantitativo de las muestras obtenidas a partir de las reacciones de síntesis catalizadas por la lipasa CalB				
Temperatura (°C)	[Emim][EtSO <sub>4</sub> ]		[Emim][CH <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ]	
	( <i>R</i> )-feniletil hexanoato (mM)	( <i>S</i> )-feniletil hexanoato (mM)	( <i>R</i> )-feniletil hexanoato (mM)	( <i>S</i> )-feniletil hexanoato (mM)
15	0.024 (37.37)	0.027 (47.87)	0.025 (39.30)	0.028 (49.64)
20	0.031 (48.74)	0 (0)	0.034 (53.45)	0 (0)
25	0.021 (33.01)	0 (0)	0.033 (51.88)	0 (0)
30	0.028 (44.02)	0 (0)	0.027 (42.45)	0 (0)
35	0.035 (55.03)	0 (0)	0.032 (50.31)	0 (0)
40	0.037 (58.17)	0 (0)	0.035 (55.03)	0 (0)

Los valores entre paréntesis indican el rendimiento (%) con respecto a cada enantiómero del sustrato considerando que el racemato del 1-feniletanol contiene 53% de (*R*)-1-feniletanol y 47% de (*S*)-1-feniletanol (Santillán, 2012).

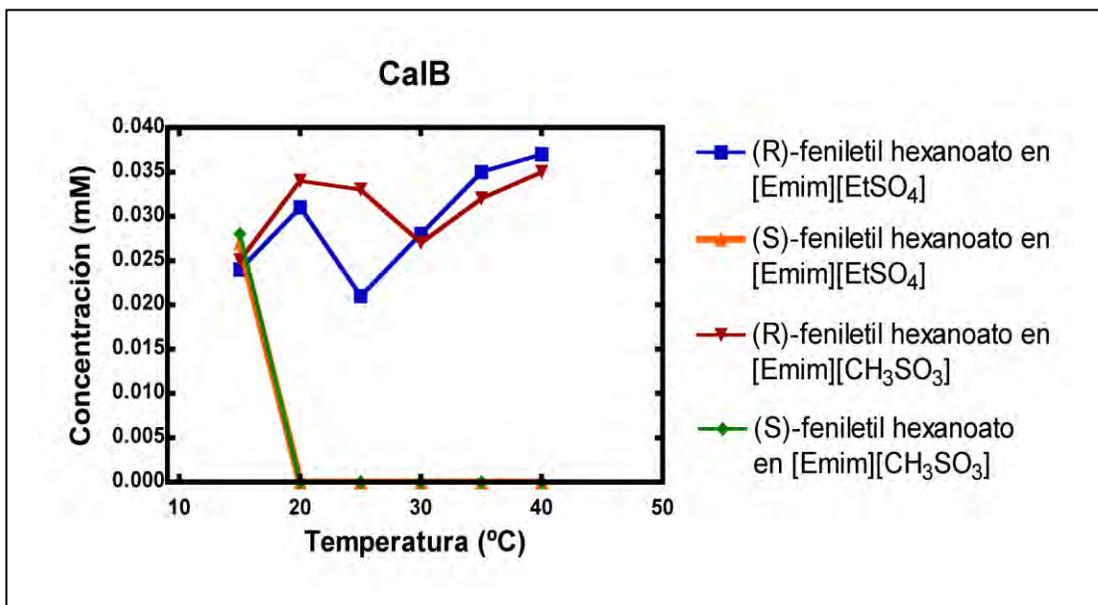


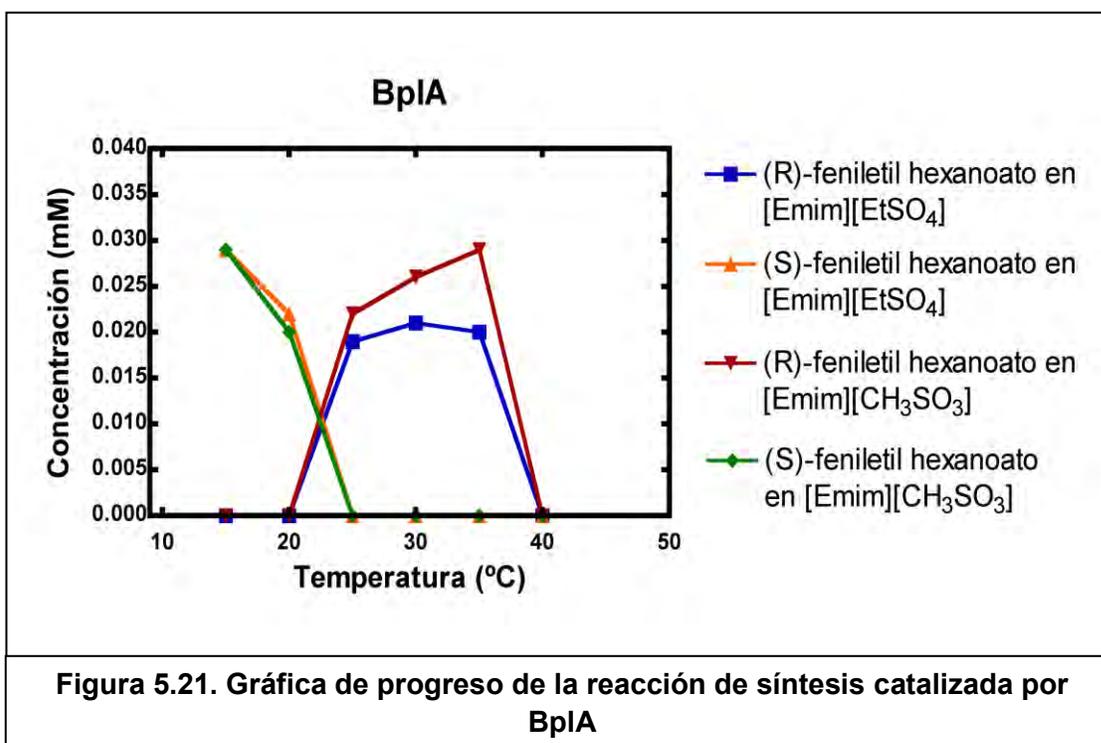
Figura 5.20. Gráfica de progreso de la reacción de síntesis catalizada por CalB

Los datos de rendimiento para CalB (Tabla 5.2), además de indicar que la conversión de sustrato a producto no fue completa, indican que el rendimiento máximo para esta enzima se encuentra alrededor de 58% (0.037 mM de (*R*)-feniletil hexanoato). Este valor fue el más alto para todas las reacciones

estudiadas, sin embargo está lejos del 100% deseable. Para llegar a ese 58% de rendimiento se tuvo que producir una cantidad de agua de al menos 0.037 mM, lo que corresponde a 0.0066% de agua en el sistema. Dada la alta estabilidad de CalB (Novozym 435) es factible suponer que, si no retiramos el agua del sistema, estamos muy cerca del equilibrio termodinámico de la reacción de síntesis-hidrólisis.

<b>Tabla 5.3. Resultados del análisis cuantitativo de las muestras obtenidas a partir de las reacciones de síntesis catalizadas por la lipasa BpIA.</b>				
	<b>[Emim][EtSO<sub>4</sub>]</b>		<b>[Emim][CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]</b>	
Temperatura (°C)	( <i>R</i> )-feniletil hexanoato (mM)	( <i>S</i> )-feniletil hexanoato (mM)	( <i>R</i> )-feniletil hexanoato (mM)	( <i>S</i> )-feniletil hexanoato (mM)
15	0 (0)	0.029 (51.41)	0 (0)	0.029 (51.41)
20	0 (0)	0.022 (39.00)	0 (0)	0.020 (35.46)
25	0.019 (29.87)	0 (0)	0.022 (34.59)	0 (0)
30	0.021 (33.01)	0 (0)	0.026 (40.88)	0 (0)
35	0.020 (31.44)	0 (0)	0.029 (45.59)	0 (0)
40	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Los valores entre paréntesis indican el rendimiento (%) con respecto a cada enantiómero del sustrato considerando que el racemato del 1-feniletanol contiene 53% de (*R*)-1-feniletanol y 47% de (*S*)-1-feniletanol (Santillán, 2012).



Los resultados cuantitativos de la síntesis catalizada por BpIA se presentan en la Tabla 5.3 y la Figura 5.21. En este caso los rendimientos son relativamente bajos comparados con CalB. Esto implica que para esta reacción no se llegó al equilibrio termodinámico. Esto puede deberse a que BpIA se inactivó o que le faltó tiempo. Ensayos a tiempos mayores no mejoraron los rendimientos por lo que concluimos que BpIA realmente se inactivó. Recordemos además que en todas las reacciones se usó la misma cantidad de catalizador y que CalB presentó la mayor actividad (10.6 U/g, Tabla 5.1) mientras que BpIA presentó la menor actividad (3.9 U/g). La inactivación de estas enzimas no necesariamente sigue un patrón común, pero es claro que a mayor tiempo, ocurre una mayor inactivación. Del mismo modo, la actividad residual siempre dependerá de la actividad inicial. Es posible que BpIA

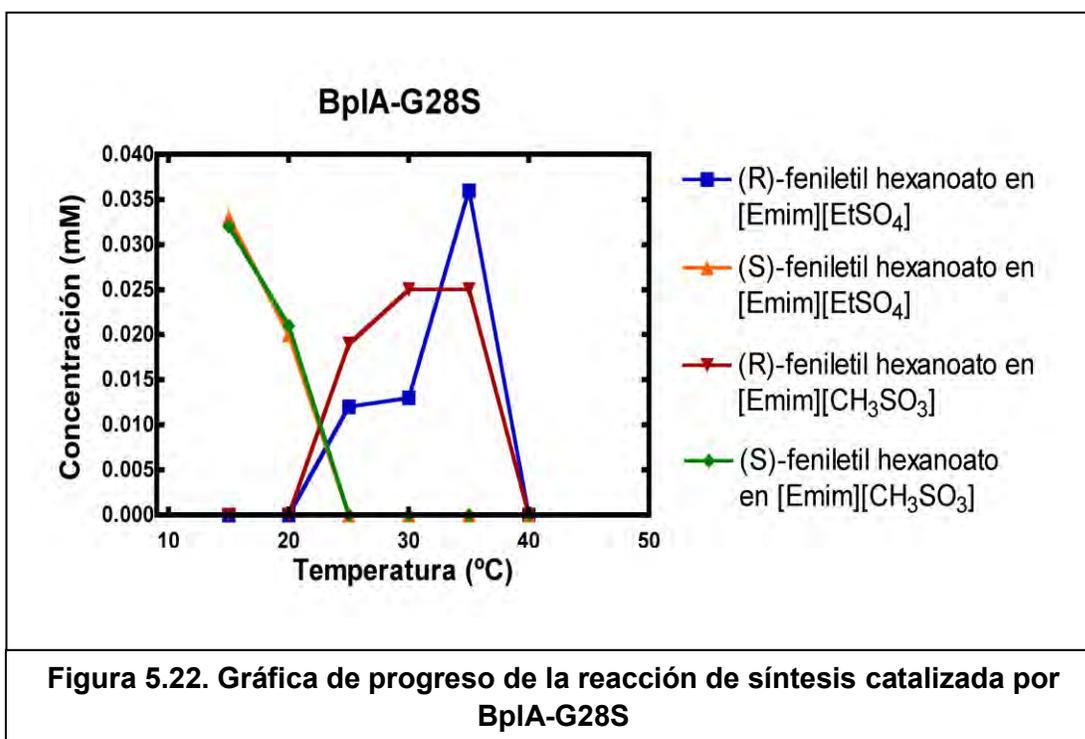
se inactive mucho más pronto que CalB no sólo por la naturaleza de la BpIA, sino porque se uso una cantidad menor de enzima activa.

Finalmente, BpIA-G28S mostró datos de conversión mucho mejores que BpIA pero no tan buenos como CalB. En la Tabla 5.4 se observa que a 15°C (para el enantiómero *S*) se obtiene un rendimiento casi tan bueno como el mejor rendimiento de CalB a 40°C. En contraste, a 35°C, BpIA-G28S presenta un rendimiento casi tan bueno como CalB a 40°C. En esta ocasión las unidades de actividad empleadas es mucho más parecido entre CalB y BpIA-G28S (10.6 y 9.2 U/g, respectivamente).

En el caso de las lipasas de *B. pumilus*, podemos observar que el rendimiento mejora conforme nos alejamos de la  $T_r$ . Lo cual concuerda con lo predicho por las ecuaciones 2 y 5.

Tabla 5.4. Resultados del análisis cuantitativo de las muestras obtenidas a partir de las reacciones de síntesis catalizadas por la lipasa BpIA-G28S.				
Temperatura (°C)	[Emim][EtSO <sub>4</sub> ]		[Emim][CH <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ]	
	( <i>R</i> )-feniletil hexanoato (mM)	( <i>S</i> )-feniletil hexanoato (mM)	( <i>R</i> )-feniletil hexanoato (mM)	( <i>S</i> )-feniletil hexanoato (mM)
15	0 (0)	0.033 (58.51)	0 (0)	0.032 (56.73)
20	0 (0)	0.02 (35.46)	0 (0)	0.021 (37.23)
25	0.012 (18.86)	0 (0)	0.019 (29.87)	0 (0)
30	0.013 (20.44)	0 (0)	0.025 (39.30)	0 (0)
35	0.036 (56.60)	0 (0)	0.025 (39.30)	0 (0)
40	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Los valores entre paréntesis indican el rendimiento (%) con respecto a cada enantiómero del sustrato considerando que el racemato del 1-feniletanol contiene 53% de (*R*)-1-feniletanol y 47% de (*S*)-1-feniletanol (Santillán, 2012).



De estos resultados se desprende el hecho de que ambas lipasas de *B. pumilus* catalizaron la reacción de síntesis en los LI ensayados y que esta síntesis procede de forma enantioselectiva. En contraste, la enzima CalB perdió enantioselectividad a 15°C. Lo más importante es que podemos invertir la enantioselectividad de las lipasas de *B. pumilus* por cambios de temperatura en un intervalo bastante cómodo.

Cabe mencionar que en los últimos años, se han hecho numerosos experimentos de reacciones catalizadas por lipasas en medio no convencionales, donde se han propuesto diferentes sistemas de reacción, en su gran mayoría los problemas que se han suscitado son el bajo rendimiento de conversión de triacilglicéridos y la baja selectividad del proceso para un grado específico de esterificación. Para resolver este problema se han utilizado métodos como la ingeniería de

disolventes. En el presente trabajo se utilizaron dos LI cuyo comportamiento era desconocido incluso para CalB. Estos LI, sin embargo, no permiten la eliminación de agua por métodos sencillos como es la presencia de una malla molecular. Esto representa un reto tecnológico que seguramente será superado mediante la inclusión de algún proceso químico o enzimático que, de forma simultánea con la reacción de síntesis de ésteres, consuma agua sin afectar a las lipasas.

## Capítulo 6. Conclusiones y perspectivas

### 6.1 Conclusiones

- Las enzimas BplA y BplA-G28S inmovilizadas son capaces de realizar reacciones de síntesis de 1-feniletil hexanoato en los LI ensayados.
- Las lipasas BplA y BplA-G28S son enantioselectivas para la síntesis de 1-feniletil hexanoato, partiendo de ácido hexanoico y (*R,S*)-feniletanol como sustratos. Se encontró que a  $T \geq 25^{\circ}\text{C}$  estas enzimas utilizan el enantiómero *R* del alcohol, mientras que a  $T \leq 20^{\circ}\text{C}$ , utilizan el enantiómero *S* del alcohol.
- La combinación de las lipasas inmovilizadas de *B. pumilus* con los LI [Emim][CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>] o [Emim][EtSO<sub>4</sub>] permiten la aparición de la isoinversión con una  $T_r$  que se encuentra entre 20 y 25°C.
- La enantioselectividad observada para las lipasas de *B. pumilus* es aparentemente absoluta. Aunque es posible que la detección del enantiómero minoritario se encuentre fuera del alcance de nuestros métodos analíticos.
- La síntesis de 1-feniletil hexanoato en [Emim][CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>] o [Emim][EtSO<sub>4</sub>] como medio de reacción, catalizada por CalB, no procede con enantioselectividad a 15°C, mientras que tiene preferencia por el alcohol *R* entre 20 y 40°C.
- Las enzimas BplA y BplA-G28S se inactivan a 40°C en las condiciones de reacción utilizadas.

## 6.2 Perspectivas

- Desarrollar un método que permita la eliminación de agua del medio de reacción sin afectar la síntesis de ésteres en LI.
- Realizar ensayos en intervalos de temperatura más pequeños y estudiar el efecto del cambio de temperatura en la enantioselectividad de las lipasas BpIA y BpIA-G28S. Esto para definir exactamente la  $T_r$ .
- Probar otros métodos de inmovilización para las lipasas de *B. pumilus* con el objeto de mejorar su estabilidad en LI.

---

## Bibliografía

1. Alcántara, M. (2009). “Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica de *Bacillus pumilus* aislado de un producto lácteo tradicional mexicano”. *Tesis de Maestría, UNAM*.
2. Arpigny JL y Jaeger KE. (1999). “Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties”. *Biochem J.* 343, 177–183.
3. Benitez, M. (2009). “Inmovilización de la lipase de *Bacillus pumilus* GMA1 y actividad en disolventes orgánicos”. *Tesis de Licenciatura, UNAM*.
4. Berkeley N.et.al. (1984). “Identificación of *Bacillus* species”. *Meth. Microbiol.* 16, 291-328.
5. Brzozowski A, Derewenda U, Derewenda ZS, Dodson G, Lawson D, Turkenburg J, Bjorkling, Hüge-Jensen B, Patkar S, Thim L. (1991). “A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex” *Nature* 351, 491-494.
6. Bustos I. (1995). “Aislamiento selectivo de un microorganismo productor de lipasas proveniente de un ambiente extremo”. *Tesis de Licenciatura, UNAM*.
7. Bustos I. (1998). “Análisis del gen que codifica para la lipasa de *B. pumillus* GMA1”. *Tesis de Maestría, UNAM*.
8. Bustos I, Hummel W, Eggert T, Bogo E, Puls M, Weckbecker A, Jaeger KE. (2009). “A High-throughput screening method for chiral alcohols and its application to determine enantioselectivity of lipases and esterases”. *ChemCatChem* 1,445-448.
9. Bustos I, Mora R, Calcagno M, Farrés A. (2010). “Kinetic studies of Gly28:Ser, mutant form of *Bacillus pumilus* lipase: changes in *kcat* and thermal dependence”. *BBA-Proteins Proteom* 1804, 2222-2227.
10. Cainelli G, de Matteis V, Galletti P, Giacomini D, Oriolo P. “Temperature and solvent effects on enzyme stereoselectivity; inversión temperatura in kinetic resolutions with lipases”. *Chem. Commun.* 2000, 2351–2352.

- 
11. Derewenda U, Brzozowski AM, Lawson DM, y Derewenda Z. (1992). "Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase." *Biochemistry* 31, 1532-1541.
  12. Derewenda ZS, Sharp AM. (1993) "News from the interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases". *Trends Biochem. Sci.* 18, 20-25.
  13. Derewenda ZS, Derewenda U, Dodson GG. (1992). "The Crystal and Molecular Structure of the *Rhizomucor miehei* Triacylglyceride Lipase at 1.9 Å Resolution". *J. Mol. Biol* 227, 818-839.
  14. Detry J, Rosenbaum T, Lutz S, Hahn D, Jaeger KE, Muller M, Egeert T. (2006). "Biocatalytic production of enantiopure cyclohexane- trans-1, 2- diol using extracellular lipases from *Bacillus subtilis*". *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 72, 1107-1116.
  15. Ferrato F, Carriere F, Sarda L, Veger R. (1997). "A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation". *Annu. Rev. Microbiol* 122, 327–347.
  16. Harwood C. (1992). "*Bacillus subtilis* and its relatives: molecular, biological and industrial workhorses". *TIBTECH* 10, 247-256.
  17. Hasan F, Shah AA, Hameed A. (2006). "Industrial applications of lipases". *Enzyme Microb. Technol* 39,235-351.
  18. Jaeger KE, Eggert T. (2002). "Lipases for biotechnology". *Curr. Opin. Biotech.* 13, 390 – 397.
  19. Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT. (1999). "Bacterial Biocatalysts: Biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases". *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 315-51.
  20. Jaeger KE, Reetz MT. (1998). "Microbial lipases from versatile tools for biotechnology". *Trends Biotechnol.* 16, 396 – 403.
  21. Klibanov AM. "Improving enzymes by using them in organic solvents". *Nature* 2001, 241-346.

- 
22. Kumar A, Gross RA. (2000). "Candida antarctica Lipase B-Catalyzed Transesterification: New Synthetic Routes to Copolyesters". *J. Am. Chem. Soc.* 122, 11767-11770.
  23. Lozano P, De Diego T, Carrié D, Vaultier ML, Inorra J."Enzymatic ester Synthesis in ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzimatic.* 2003, 9-13.
  24. Mora R. (2008). "Propiedades catalíticas y termoestabilidad de la lipasa recombinante de *Bacillus pumillus* GMA1". *Tesis de Maestría, UNAM.*
  25. Ollis DL, She E, Cyger M, Dijkstra B, Frolow F, et. al. (1992). "The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold". *Protein Eng.* 5, 197–211.
  26. Pearson B. (1991). "Speciality chemicals". *Elsevier science publishers LTD,* 473-508.
  27. Phillips RS. (1996). "Temperature modulation of the stereochemistry of enzymatic catalysis: Prospects for exploitation". *TIBTECH* 14, 13–16.
  28. Santillán, H. (2012). "Estudio de la enantioselectividad hidrolítica de la lipasa de *Bacillus pumilus*". *Tesis de Licenciatura, UNAM.*
  29. Sarda L, Desnuelle P. (1958). "Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion". *Biochim Biophys* 30, 513-21.
  30. Seongsoon P, Romas J. (2003). "Biocatalysis in ionic liquids – advantages beyond green technology". *Elsevier science publishers,* 432-437.
  31. Van Pouderoyen G, Eggert T, Jaeger KE, Dijkstra BW. (2001). "The cristal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal  $\alpha/\beta$  hydrolase fold enzyme". *J. Mol. Biol.* 309, 215–226.
  32. Van Tilbeurgh H, Egloff MP, Martínez C, Rugani N, Verger R, et al. (1993). "Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography". *Nature* 362,814-820.
  33. Verger R. (1997). "Interfacial activation" of lipases: facts and artifacts". *Trends Biotechnol* 15, 32-38.

34. Verschueren GKH, Seljée F, Rozeboom HJ, Kalk KH, Dijkstra BW. (1993). "Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase". *Nature* 363, 693–698.
35. Wade LGJr. (2004). "Química Orgánica". Capítulo 5: Estereoquímica. *Ed. Pearson Education*, 167-207.
36. Willeman WF, Hanefeld U, Straathof AJJ, Heijnen JJ. (2000). "Estimation of kinetic parameters by progress curve analysis for the synthesis of (R)-mandelonitrile by *Prunus amygdalus* hydroxynitrile lyase". *Enzyme Microb. Technol* 27, 423–433.
37. Wong, De la Mora P. (2001). "Lipasa termoestable de *Bacillus pumilus* GMA1: producción fermentativa y algunas propiedades". *Tesis de Licenciatura, UNAM*.
38. Zhen Yang, Wubin Pan. (2005). "Ionic Liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis". *Enzyme Microb. Technol* 37, 219-28.