

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
BIBLIOTECA CIÈNCIES

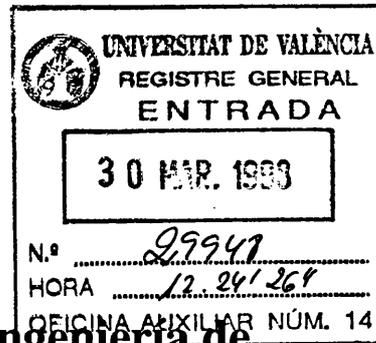
Nº Registre 12042

DATA 22-6-98

SIGNATURA T. D. 521

Nº LIBRE: 20920581





**Desarrollo de nuevas estrategias de ingeniería de  
enzimas lipolíticos destinadas a incrementar su  
eficacia en aplicaciones biotecnológicas**

**Estudio de la activación de lipasas por moléculas anfipáticas**

Memoria presentada por  
**HERMINIA GONZÁLEZ NAVARRO**  
para optar al grado de  
**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Directores

Dr.Lorenzo Braco Soler y Dra.Concepción Abad Mazarío

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
*Departament de Bioquímica i Biologia Molecular*

UMI Number: U603063

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U603063

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346



Este trabajo ha sido dirigido por los Doctores D.Lorenzo Braco Soler Profesor Titular, fallecido el 30 de Enero de 1997, y Dña.Concepción Abad Mazarío, Catedrática del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. La Dra. Dña.Concepción Abad Mazarío,

CERTIFICA: que Herminia González Navarro, licenciada en CC. Biológicas, ha desarrollado bajo su dirección, el trabajo con el título "Desarrollo de nuevas estrategias de ingeniería de enzimas lipolíticos destinadas a incrementar su eficacia en aplicaciones biotecnológicas" para optar al grado de Doctora.

Y para que conste firmo la presente en Burjassot a 16 de Marzo de 1998,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'C. Abad'.

Fdo: Concepción Abad Mazarío



# Índice

## Abreviaturas

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Las lipasas y el fenómeno de 'activación interfacial'	1
1.2. Estructura y heterogeneidad conformacional de las lipasas	3
1.3. Las lipasas en las biotransformaciones industriales	8
1.3.1. Aplicaciones industriales de las lipasas	8
1.3.2. Enzimología en medios no convencionales	9
1.3.3. Métodos para aumentar la actividad catalítica en medios no convencionales	13
1.3.4. Impresión molecular basada en la 'activación interfacial' de enzimas lipolíticas (estrategia de TPI)	15
1.4. Objetivos	18
<b>2. Materiales y métodos</b>	<b>19</b>
2.1. Materiales	19
2.2. Purificación de lipasas de diferentes orígenes	20
2.2.1. Semipurificación de la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i>	20
2.2.2. Purificación de las lipasas para ensayos acuosos	20
2.2.2.1. Lipasa de <i>Candida rugosa</i>	20
2.2.2.2. Lipasa de <i>Geotrichum candidum</i>	21
2.2.2.3. Lipasas de <i>Rhizopus delemar</i> y <i>Humicola lanuginosa</i>	21
2.3. Estudio de la actividad lipasa en medios no convencionales	22
2.3.1. Preparación de muestras	22
2.3.2. Ensayo de la actividad lipasa	24
2.3.2.1. Reacciones de esterificación directa	24
2.3.2.2. Reacciones en medio libre de disolvente	24
2.3.2.3. Reacciones de polimerización	25
2.3.2.4. Reacciones de acidólisis con triglicéridos	25
2.3.3. Seguimiento y análisis de las reacciones por HPLC	25
2.4. Estudio de la actividad lipasa en medio acuoso	27
2.4.1. Ensayo y seguimiento de la actividad lipasa	27
2.4.2. Estudio de la influencia de n-octil- $\beta$ -D-glucopiranosido y acil derivados en la actividad lipasa	28

2.5. Estudio mediante electroforesis de la interacción lipasa-palmitoil coenzima A marcado radiactivamente	29
--	----

### 3. Resultados y Discusión

3.1. Estudio de la activación de lipasas mediante la interacción con moléculas anfipáticas	32
3.1.1. Estudio de la influencia del n-octil- $\beta$ -D-glucopiranosido en la actividad lipasa	32
3.1.1.1. Estudio de la interacción lipasa-n-OG en tampón acuoso	32
3.1.1.1.1. Efecto directo de la interacción en la actividad esterolítica y lipolítica	32
3.1.1.1.2. Pre-incubación de la lipasa con detergente. Efecto de memoria	34
3.1.1.1.3. Efecto del detergente en la actividad lipasa hacia una lipoproteína artificial	39
3.1.1.2. Estudio de la actividad de la lipasa de <i>Candida rugosa</i> mediante la estrategia de TPI. Seguimiento de la actividad en medios no convencionales	41
3.1.1.2.1. Estudio de la influencia de la concentración de detergente en el tampón previo a la liofilización sobre la actividad en disolvente orgánico	41
3.1.1.2.2. Efecto de la concentración de detergente en la actividad hacia triglicéridos de diferente longitud de cadena acilo	43
3.1.1.3. Activación inducida por el detergente. ¿Cuántas conformaciones existen en disolución acuosa?	44
3.1.2. Estudio de la interacción lipasa-acilderivados del coenzima A en medio acuoso	47
3.1.2.1. Efecto directo del palmitoil coenzima A sobre la actividad esterolítica y lipolítica	47
3.1.2.2. Estudio del efecto de los acil-CoA derivados de diferente longitud de cadena acilo sobre la actividad esterolítica y lipolítica de la lipasa de <i>Geotrichum candidum</i>	48
3.1.2.3. Efecto de los acil-CoA derivados en las actividades esterolíticas de la tripsina y la	

quimotripsina y en la actividad lipolítica de la lipasa de cobaya	51
3.1.2.4. Estudio de la interacción lipasa- <sup>3</sup> Hpalmitoil-CoA y seguimiento por fluorografía	53
3.2. Estudio de la aplicabilidad de la estrategia de TPI a reacciones de interés biotecnológico en medios no convencionales	56
3.2.1. Aplicación de la estrategia TPI en reacciones para la obtención de ésteres de fragancias	56
3.2.1.1. Estudio de la actividad lipasa y rendimientos en la esterificación directa de alcoholes terpénicos	56
3.2.1.2. Estudio de la influencia del ácido graso en la esterificación	61
3.2.2. La estrategia de TPI en reacciones en medio libre de disolvente	63
3.2.2.1. Esterificación directa	63
3.2.2.2. Transesterificación	65
3.2.3. Reacciones de polimerización	67
3.2.4. Acidolisis de triglicéridos	70
3.2.4.1. Activación mediante la estrategia de TPI en la reacción de acidolisis de triglicéridos	70
3.2.4.2. Estudio de la selectividad de triglicérido de las lipasas activada y no activada	72
3.2.5. Consecuencias generales de la estrategia de TPI	75
3.2.5.1. Comparación de la estrategia con otros métodos de aumento de la actividad catalítica en medios no acuosos	75
3.2.5.2. Estabilidad de la lipasa en medios no acuosos. ¿Conformación de la lipasa abierta o cerrada en medios no acuosos?	78
<b>4. Conclusiones</b>	<b>80</b>
<b>5. Bibliografía</b>	<b>82</b>



## Abreviaturas

acil-CoA	acilderivado del coenzima A
AOT	bis-2-etilhexil sulfosuccinato sódico (Aerosol OT)
cmc	concentración micelar crítica
CPG	perlas de vidrio poros
DEAE	dietilaminoetil
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiamino-tetraacético
FTIR	espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier
Hepes	ácido 2-(N-(2-hidroxietil) piperazin)-etanosulfónico
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
MES	ácido 2-(N-morfolín)etanosulfónico
n-OG	n-octil- $\beta$ -D-glucopiranosido
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
Pal-CoA	palmitoil coenzima A
PNP-propionato	éster propiónico del p-nitrofenol
RMN	resonancia magnética nuclear
SDS	dodecil sulfato sódico
TG	triacilglicerol
TPI	atrapamiento de confórmeros en presencia de interfases
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano



# 1. Introducción

## 1.1. Las lipasas y el fenómeno de la 'activación interfacial'

Las lipasas (E.C.3.1.1.3 triacilglicerol hidrolasas) constituyen una familia de enzimas que hidrolizan triglicéridos originando ácidos grasos, diglicéridos y en algunos casos hasta monoglicéridos y glicerol. Estas enzimas están presentes en diversos organismos incluyendo plantas, animales, hongos y bacterias, mostrando un amplio intervalo de especificidades de sustrato y posición, así como de pesos moleculares y actividades catalíticas. Aunque las lipasas son capaces de degradar sustratos monoméricos, sólo alcanzan la total actividad en presencia de interfases, exhibiendo un aumento de actividad enzimática cuando actúan sobre interfases lípido/agua. Esto hace que la mayoría de ellas no se comporten cinéticamente como enzimas clásicos de tipo Michaelis-Menten. Esta propiedad, denominada 'activación interfacial', las diferencia de las esterasas y fue observada por primera vez por Sarda & Desnuelle en 1958 convirtiéndolas en unos enzimas únicos. Los sustratos naturales de estas enzimas, triglicéridos y grasas en general, poseen baja solubilidad por lo que a altas concentraciones forman emulsiones, que consisten en agregados moleculares que ofrecen al enzima interfases. De este modo, cuando la solubilidad del sustrato es excedida, el enzima experimenta una activación asociada a la aparición de la emulsión. Esta propiedad de activación en presencia de interfases que las lipasas comparten con otro enzima lipolítico, la fosfolipasa A<sub>2</sub> (Verheij *et al*, 1981), no se ha observado en ninguna otra familia de enzimas.

En un contexto más fisiológico la situación es más compleja. Así, en mamíferos la lipasa que efectúa la hidrólisis de triglicéridos en el intestino delgado iniciando el metabolismo de lípidos y se denomina 'lipasa pancreática' es dependiente de colipasa. La colipasa es una proteína de bajo peso molecular que se acompleja con ella (a relación molar 1:1) y actúa de cofactor para llevar a cabo la hidrólisis del sustrato. En condiciones fisiológicas, la lipasa pancreática se encuentra fuertemente inhibida por las sales biliares que producen una

desadsorción general de proteínas de las emulsiones y por lo tanto, de la lipasa de su sustrato en emulsión. La colipasa interviene aumentando la afinidad de la lipasa por su sustrato, revertiendo el efecto de las sales biliares en el enzima y ofreciéndole a éste un brazo hidrofóbico de alta afinidad por interfases (revisado en Embleton & Pouton, 1997; Lowe, 1997). En microorganismos, las lipasas son enzimas que se secretan, para la degradación de las grasas y aceites del medio, con el fin de obtener ácidos grasos como fuente de carbono (Jaeger *et al.*, 1994).

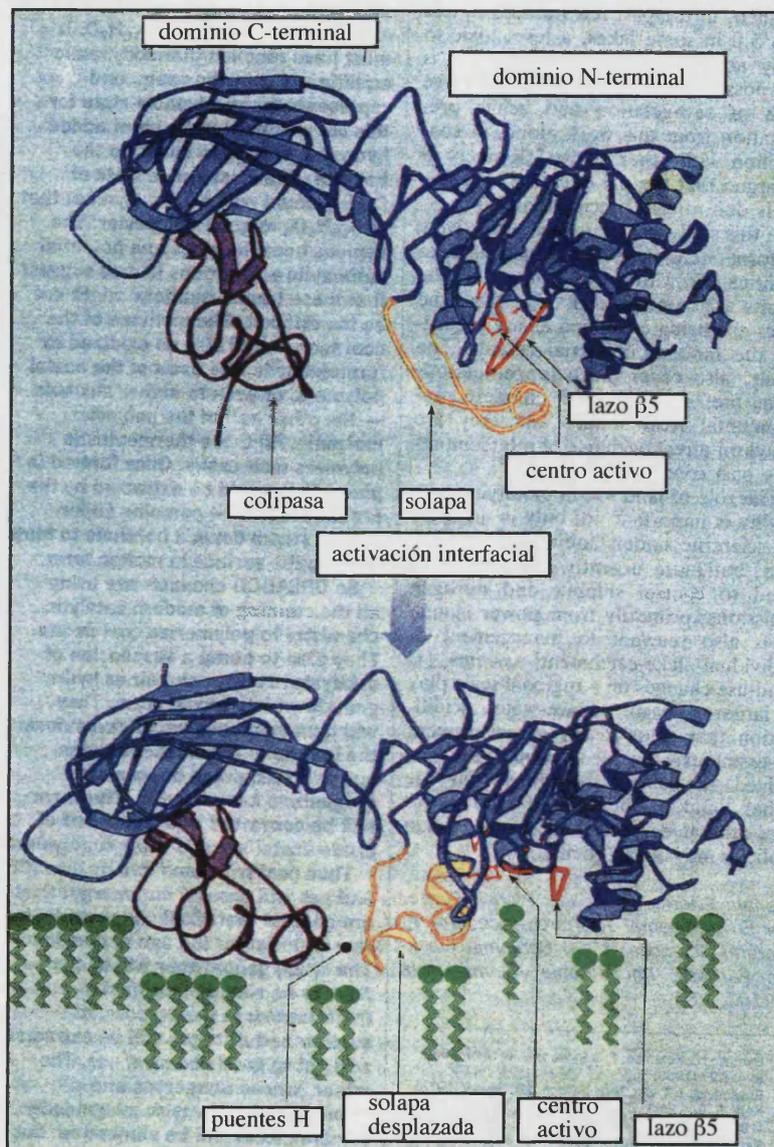
Con el fin de esclarecer la base molecular del fenómeno de 'activación interfacial' se han realizado numerosos estudios moleculares a partir de los cuales han surgido dos teorías para su explicación. La 'teoría del sustrato' (Brockhoff H., 1968) establece que las propiedades del sustrato son las responsables del fenómeno. Así defienden que a altas concentraciones de sustrato la formación de agregados da lugar a un gradiente de concentración en la interfase (Brockman *et al.*, 1973), con una mejor orientación de los grupos éster de los enlaces hidrolizables y una reducción de agua alrededor de dichos enlaces, favoreciendo de este modo la catálisis y provocando el fenómeno de activación observado. La 'teoría del enzima' (Desnuelle *et al.*, 1960) por el contrario, atribuye al enzima la activación, basada en un cambio conformacional hacia una forma más activa cuando se adsorbe a la interfase asemejándose, de este modo, al paradigma del cambio conformacional de la transición de la forma tensa ( $T_0$ ) a la forma relajada ( $R_0$ ) de las proteínas cooperativas. Así, del mismo modo que en estas proteínas se produce un aumento de la forma activa ( $R_0$ ) en presencia del sustrato favoreciendo la unión de otras moléculas de sustrato, la presencia de una interfase (sustrato) provocaría la unión, a la enzima, de más moléculas de sustrato. Más recientemente, se han llevado a cabo numerosos estudios moleculares sobre la dinámica y estructura de monocapas que apoyan la influencia que ejerce el sustrato en el fenómeno (Peters *et al.*, 1995; Muderhwa & Brockman, 1992). Por otro lado, tanto la resolución cristalográfica de lipasas de diferentes organismos, la cual se describe a continuación, como los estudios mediante RMN de la fosfolipasa  $A_2$  en disolución acuosa (van der Berg *et al.*, 1995a; 1995b) aportan evidencias estructurales que avalan la 'teoría del enzima'.

## 1.2. Estructura y heterogeneidad conformacional de las lipasas

En 1990 se obtuvo la primera evidencia estructural que apoyaba la 'teoría del enzima', cuando se resolvieron, mediante cristalografía de rayos X, las primeras estructuras de lipasa, que fueron las de la lipasa de *Rhizomucor miehei* (Brady *et al.*, 1990) y la de páncreas humano (Winkler *et al.*, 1990). En ambas estructuras se observó, además del plegamiento típico  $\alpha/\beta$  hidrolasa y la tríada catalítica Ser-His-Asp(Glu) clásica de las esterasas (Ollis *et al.*, 1992), la presencia de un elemento estructural flexible o lazo anfifílico, cubriendo, a modo de solapa, el centro catalítico haciéndolo, de este modo, inaccesible al medio. Esta primera observación, llevó a los autores a sugerir que debe producirse un cambio estructural implicando la reorientación de esta solapa para que tenga lugar la catálisis, ya que de otro modo el acceso del sustrato al centro activo se ve dificultado, siendo este cambio el causante de la 'activación interfacial'. Además, poco después se resolvieron las estructuras de las mismas lipasas en sus formas abiertas o activadas obtenidas al ser cristalizadas en presencia de un inhibidor covalente (Brzozowski *et al.*, 1991) o micelas mixtas (van Tilbeurgh *et al.*, 1993). La comparación de estas estructuras entre sí, así como la obtención de la forma abierta de la lipasa de *Candida rugosa* (Grochulski *et al.*, 1993), ofrecieron la base estructural para dar una descripción detallada de los cambios que pueden estar implicados en la 'activación interfacial'. En la Figura 1 se muestra un diagrama con ambas estructuras de la lipasa pancreática humana en la que se plasman los cambios conformacionales que se observaron para la lipasa pancreática humana y que se resumen en: (i) un acceso facilitado del sustrato al centro activo, (ii) la formación de un área hidrofóbica que es expuesta durante el cambio conformacional estabilizada por adsorción a la interfase hidrofóbica, (iii) la formación del llamado canal oxianiónico que estabiliza el intermediario tetraédrico durante la catálisis y (iv) en este caso de la lipasa pancreática, la interacción de la colipasa con el dominio C-terminal de la lipasa.

Hasta la fecha, se han obtenido numerosas estructuras de lipasas de diferentes orígenes a partir de la resolución de sus cristales por difracción de rayos X, permitiendo una mejor comprensión de su mecanismo de catálisis. Las lipasas cuyas estructuras se han resuelto son las procedentes de los siguientes organismos: *Geotrichum candidum* (Schrag & Cygler, 1993; Schrag *et al.*, 1991), *Candida rugosa* (Grochulski *et al.*, 1993), *Pseudomonas glumae* (Noble *et al.*, 1993), *Rhizopus delemar* (Derewenda *et al.*, 1994c), *Humicola lanuginosa* (Lawson *et al.*, 1994), *Penicillium camembertii* (Derewenda *et al.*,



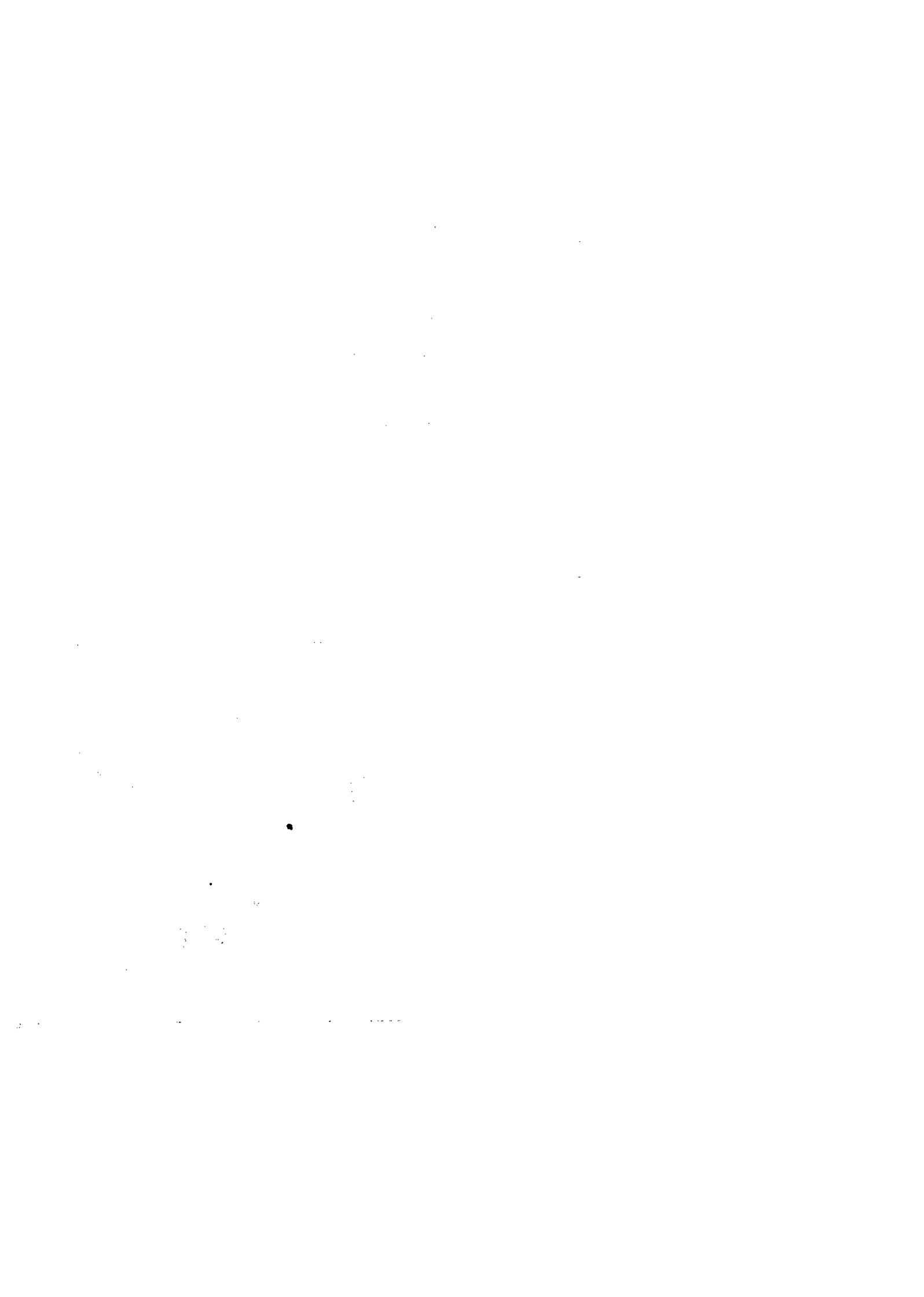


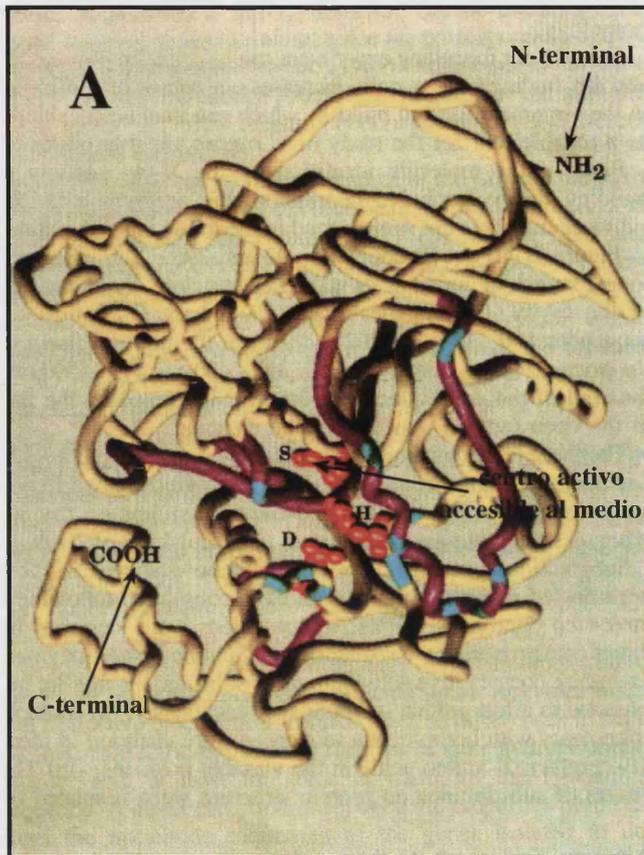
**Figura 1. Esquema de la activación interfacial de la lipasa de páncreas humano.** Formas conformacionales (A) cerrada y (B) abierta (inducida con una micela mixta) de la lipasa interactuando con la colipasa, deducidas a partir de difracción de rayos X (adaptado de Riddihough, 1993). En amarillo se indica la solapa, en rojo el lazo  $\beta 5$  y en magenta la colipasa. En el esquema se observa el desplazamiento de la solapa inducido por las micelas mixtas (en verde), la cual al ser desplazada interactúa con la colipasa mediante puentes de hidrógeno. El lazo  $\beta 5$  que resulta también desplazado, expone residuos apolares y oculta los polares. El centro activo queda expuesto al medio



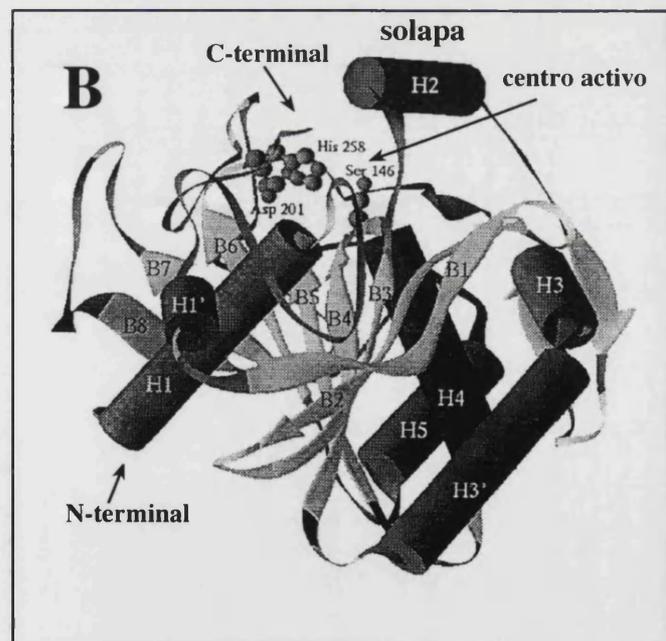
1994a), *Candida antarctica* (Uppenberg *et al.*, 1994) *Chromobacterium viscosum*. (Lang *et al.*, 1996), páncreas porcino (Hermoso *et al.*, 1996) y *Pseudomonas cepacia* (Kim *et al.*, 1997). En todas ellas se observaron las mismas características estructurales que en las lipasas descritas anteriormente estableciéndose la base molecular para su comportamiento y las relaciones evolutivas entre ellas. A pesar de la diversidad en la secuencia y en la longitud de la cadena, las lipasas descritas hasta el momento comparten al menos cuatro características: (i) uno o dos dominios  $\alpha/\beta$ ; el dominio catalítico contiene una hoja  $\beta$  plegada de entre 8 y 11 cadenas superimpuestas; un núcleo de 5 hojas  $\beta$  paralelas; y en el caso de las de mamífero un segundo dominio definido C-terminal no catalítico. (ii) todas ellas contienen el motivo Gly-X<sub>1</sub>-Ser-X<sub>2</sub>-Gly en el que la serina es esencial para la catálisis. (iii) la tríada catalítica típica de esterases, observada en las otras lipasas Ser...His...Asp(Glu) y (iv) esta tríada, está situada en un giro entre una hoja  $\beta$  y una  $\alpha$  hélice y está cubierta igual que en los casos anteriores por la solapa anfipática, con el lado en contacto con el centro activo hidrofóbico y el opuesto polar, formada en algún caso por mas de un lazo (Lawson *et al.*, 1992). En la Figura 2 se muestran las estructuras de de las lipasas de *Candida rugosa* la cual esta muy relacionada y pertenece a la misma familia que la de *Geotrichum candidum* y la lipasa del hongo de *Humicola lanuginosa* a modo de ejemplo de estructuras. Estas evidencias cristalográficas, hicieron que los autores sugiriesen que el cambio conformacional inducido por una interfase, el cual facilita la accesibilidad al centro activo, es la causa de la elevada actividad observada en el enzima, y defendiendo cada vez mas la 'teoría del enzima'.

Además, por otro lado, se describieron las estructuras de otros dos enzimas relacionados con las lipasas que apoyan también la teoría. Por un lado, la descripción de la pequeña solapa de la lipasa de cobaya, enzima íntimamente relacionado con la pancreática de mamíferos (Hjorth *et al.*, 1993). Esta lipasa se caracteriza por carecer de 'activación interfacial', hecho que se relaciona con el pequeño tamaño de su solapa. Por otro lado, posee actividad fosfolipasa, actividad que en las lipasas sólo es marginal, y que también se relaciona con la solapa, que en el caso de la lipasa de cobaya al ser de pequeño tamaño se cree que facilitaría la entrada del fosfolípido al centro activo (Carrière *et al.*, 1994). El otro enzima cuya estructura ha sido descrita, la cutinasa de *Fusarium solani* es un enzima de bajo peso molecular y degrada cutina, un lípido poliéster de la superficie de las plantas. Igual que en el caso de la lipasa de cobaya esta lipasa





**Figura 2.**  
**Estructuras de las lipasas de *Candida rugosa* y de *Humicola lanuginosa*.** (A) Representación de Ribbon de la lipasa (LIP) de *C.rugosa*; en amarillo se indican las zonas altamente conservadas con la lipasa de *G.candidum* y en color magenta las diferencias de secuencia y conformacionales para las mismas (adaptada de Lotti *et al.*, 1994); la tríada catalítica se muestra en rojo y en azul los residuos variables no identificados en dicho análisis.



(B) Esquema de la estructura de *H.lanuginosa* representando la arquitectura de las lipasas de la familia de *R.miehei* (lipasas de *H.lanuginosa*, *R.deleamar*, *R.miehei*) (adaptado de Derewenda *et al.*, 1994).



no exhibe 'activación interfacial' a pesar de degradar lípidos y, siendo estructuralmente similar a las lipasas, carece de solapa, presentando además, el canal oxianiónico del centro activo preformado (Martinez *et al.*, 1994). La descripción por lo tanto de estas lipasas proporcionó más evidencias para la asunción de la 'teoría del enzima'.

El análisis de las estructuras cristalizadas hasta el momento parece indicar que en las lipasas, la presencia de la solapa puede ser considerada como un determinante de la 'activación interfacial'. Sin embargo, el descubrimiento de la estructura y modo de acción de algunas lipasas ha hecho que algunos autores pongan en duda esta suposición. Así se ha demostrado que la lipasa de *Candida antarctica B*, no exhibe 'activación interfacial', pero posee la solapa cubriendo el centro activo (Uppenberg *et al.*, 1994). Las lipasas de *Myocastor coypus* (Thirstrup, *et al.*, 1994) y la pancreática de rata (Jennens & Lowe, 1995), poseen identidad de secuencia en el dominio equivalente a la solapa de las lipasas clásicas pancreáticas y sin embargo carecen del fenómeno de 'activación interfacial'. Además, se han podido obtener cristales de lipasas en disolución acuosa en las cuales la solapa está parcial o totalmente abierta en ausencia de interfases lípido-agua; estas lipasas incluyen las de *Rhizopus delemar* (Derewenda *et al.* 1994c), *Candida rugosa* (Grochulski *et al.*, 1993) *Chromobacterium viscosum* (Lang *et al.*, 1996) y la de *Pseudomonas* (Schrage *et al.*, 1997). En estos casos se ha sugerido que la solapa es más dinámica y permanece más tiempo en la forma abierta; por ejemplo, algunos estudios bioquímicos demuestran que dependiendo de las condiciones del medio es más fácil inducir la forma abierta del enzima.

Por otro lado, en un principio se postularon dos mecanismos plausibles para la inducción en el enzima de la 'activación interfacial' implicando el movimiento de la solapa (Jennens & Lowe, 1994). El primer mecanismo implica la 'pre-existencia de un equilibrio de conformeros en el que predomina la forma cerrada en ausencia de sustrato emulsificado, desplazándose el equilibrio hacia la forma abierta en presencia del mismo. El otro mecanismo implica una situación de 'todo o nada' en el que se defiende la necesidad del sustrato emulsificado para inducir la forma abierta, de modo que en ausencia de sustrato la conformación presente es la cerrada. Según cada mecanismo, la catálisis en ausencia de interfases se justifica de un modo diferente. En el primero se atribuye a la baja proporción de formas abiertas existentes, mientras que en el segundo se relaciona con los conformeros cerrados poco activos. Las evidencias estructurales obtenidas en los últimos años, nombradas anteriormente, y los

del medio como alternativa y/o complemento a la ingeniería de proteínas (Klibanov, 1986; Arnold, 1993; Carrea *et al.*, 1995).

En dichos medios, el enzima se suspende de forma particulada conteniendo una muy pequeña o baja cantidad de agua, en las que el enzima es insoluble y está, de hecho, en contacto con el disolvente. La primera cuestión que se plantea al suspender un enzima en disolvente orgánico es por qué, contrariamente a lo esperado, sigue siendo catalíticamente activo. En principio, un enzima es activo en disolución acuosa debido a su conformación, la cual está mantenida por diferentes interacciones débiles entre las que cabe destacar la presencia de puentes de hidrógenos con el agua. Así, se asume que las interacciones agua-proteína juegan un papel crucial en el plegamiento, estabilidad y función biológica de las proteínas. Es de esperar pues que la eliminación de agua pueda suponer la desnaturalización del enzima. En principio, dos explicaciones podrían proponerse para el mantenimiento de la actividad. La primera estaría relacionada con la suposición de que la conformación del enzima sea diferente en disolvente orgánico y que incluso así siga siendo catalíticamente activo. Sin embargo esta suposición estaría en contradicción con el postulado de una actividad/una conformación. La otra explicación, se basaría en el mantenimiento de la misma conformación en disolvente orgánico y por lo tanto, se mantendría intacta la actividad. Datos experimentales de estructura obtenidos con RMN de estado sólido (Burke *et al.*, 1992) y con FTIR en disolución, (Griebenow & Klibanov, 1996; Desai & Klibanov, 1995) así como la estructura de cristales de enzimas en disolvente orgánico (Xu *et al.*, 1997) demuestran la integridad conformacional del enzima en disolvente orgánico. Desde el punto de vista termodinámico el agua y el disolvente orgánico ofrecen interacciones tan diferentes que el enzima debería experimentar un cambio conformacional al pasar de un medio a otro, por lo que se postula que el enzima se encuentra atrapado cinéticamente en una conformación semejante a la nativa. Así, en el trabajo de Hartsough & Merz (1993), a partir de estudios de dinámica molecular, se postula que en disolvente orgánico aumenta el número neto de enlaces de hidrógeno intramoleculares y un aumento en la formación de puentes salinos, a lo que se atribuye la adquisición de las nuevas propiedades de los enzimas en estos medios.

Por otro lado, volviendo al papel que juega el agua en la conformación, la estructura catalíticamente activa del enzima es mantenida por muy pocas moléculas de agua, de modo que a pesar de que el enzima en disolvente orgánico se encuentre atrapado en su conformación, la completa eliminación del

agua origina la inactivación del enzima. Esto hace que el enzima pueda ser catalíticamente activo en medios no acuosos siempre que se mantenga la llamada 'agua esencial' (Klibanov, 1989). Esta agua se reduce a una monocapa de moléculas alrededor del enzima, o incluso en algunas ocasiones a menos, reduciéndose a determinadas zonas estructural o catalíticamente importantes, en las cuales el agua es necesaria para mantener la integridad estructural.

Las razones del desarrollo surgido en esta área se atribuyen a las ventajas que ofrece la utilización de enzimas en medios no convencionales (Bell *et al.*, 1995) y a la posibilidad de que los enzimas adquieran nuevas propiedades. Así, los medios no acuosos ofrecen la posibilidad de catalizar reacciones que son difíciles que transcurran en medio acuoso debido a un equilibrio termodinámico desfavorable como ocurre en los procesos biosintéticos. Estos procesos se ven favorecidos, frente a la hidrólisis, en medio orgánico. Otra ventaja es la solubilización de sustratos hidrofóbicos que permite llevar a cabo reacciones que en agua no son posibles. También cabría destacar la fácil recuperación y separación de biocatalizador y productos, así como la supresión de reacciones laterales y los bajos niveles de contaminación microbiana (Klibanov, 1989; Dordick, 1991).

Una de las propiedades mas características que adquieren los enzimas en los medios no convencionales, es una gran termoresistencia que se atribuye a la ausencia de agua (Zaks & Klibanov, 1988; Affleck *et al.*, 1992)). Aunque, como ya hemos dicho anteriormente el agua es necesaria para el mantenimiento de la estructura nativa de las proteínas, también interviene en la mayoría de procesos que inactivan irreversiblemente un enzima por calor (Klibanov & Ahern, 1987). Dichos procesos son producidos por el agua, la cual interviene como reactivo en los procesos covalentes de inactivación y ademas actua como lubricante ofreciendo a la proteína la flexibilidad necesaria, para adoptar otras conformaciones que se adquieren a altas temperaturas. La adquisición de estructuras incorrectas produce la formación de agregados y por lo tanto la desnaturalización del enzima. Todos estos procesos en medios sin, o con bajo contenido en agua, están menos favorecidos y por ello la estabilidad del enzima es mayor. Este hecho hace que los enzimas adquieren una elevada rigidez conformacional, de modo que la estructura catalíticamente activa permanezca, incluso a altas temperaturas.

Otra característica, que en ocasiones exhiben los enzimas en medios no acuosos, son los cambios de enantioselectividad y de especificidad de sustrato (Wescott & Klibanov, 1994). Esto se debe fundamentalmente al cambio de

estabilidad que experimentan los sustratos al pasar de medios acuosos a medios no acuosos. Probablemente porque, dependiendo del medio de reacción, se ven favorecidos unos isómeros frente a otros en su entrada al centro activo.

Además en los medios no convencionales aparece el concepto de 'memoria de pH' (Zaks & Klibanov, 1988). La 'memoria de pH' se refiere al estado iogénico que posee el enzima en disolvente orgánico el cual se corresponde con el que tuvo en la última disolución acuosa (Costantino *et al.*, 1997). Así, un enzima será más o menos activo en disolvente orgánico dependiendo de los grupos protonados o desprotonados que tenga.

Del mismo modo, un ligando puede crear, a elevadas concentraciones, una huella estructural en una proteína al interactuar con ella en medio acuoso. Esta huella puede ser retenida más tarde en disolvente orgánico debido a la alta rigidez conformacional mostrada por las proteínas en medios no acuosos (Zaks & Klibanov, 1986). A este fenómeno se le ha llamado 'memoria de ligando' por su analogía con la 'memoria de pH'. El enzima retendrá su conformación última que tuvo en medio acuoso. Esta propiedad ofrece la posibilidad de diseñar proteínas que unen ligandos específicos, dando lugar a la llamada (bio)impresión molecular que será comentada en el siguiente apartado.

A pesar de las ventajas mencionadas anteriormente, el principal problema que presenta la enzimología en medios no acuosos es la baja actividad que muestran los enzimas con respecto a la que exhiben en medios acuosos. Esta actividad reducida se debe a diferentes factores (Desai & Klibanov, 1995; Klibanov, 1997). Los enzimas al ser insolubles en estos medios, se presentan como suspensiones por lo que la difusión de los sustratos y la accesibilidad al centro activo puede verse restringida. Por otro lado, trabajos recientes de FTIR demuestran que la conformación del enzima se encuentra algo distorsionada en estos medios, más como consecuencia del proceso previo de deshidratación, típicamente la liofilización (Griebenow, *et al.*, 1995), que por la acción directa del disolvente orgánico sobre el enzima.

Otro hecho que afecta a la actividad es el cambio de estabilidad que sufren los sustratos, y los estados de transición, al pasar de medio acuoso a no acuoso. Así, los sustratos que son hidrofóbicos tienen su entrada al centro activo menos favorecida de lo que lo está habitualmente. Esto es porque en medio acuoso estos sustratos tienden a 'huir' del agua, debido a las interacciones desfavorables que mantiene con ella, refugiándose consecuentemente en los centros activos de los enzimas, que en muchos casos son de carácter marcadamente hidrofóbico. Si por otro lado tenemos un intermediario de

reacción tetraédrico polar, en un medio orgánico la tendencia a su formación será menor al ser menos estable. Por último, la rigidez conformacional que permite la ausencia de agua hace que el enzima pierda la plasticidad y lubricación necesarias para la acomodación y transformación del sustrato, reduciendo también su capacidad catalítica.

### *1.3.3. Métodos para aumentar la actividad catalítica en medios no convencionales*

Puesto que la actividad catalítica es mas baja en medios no convencionales que en agua, se han propuesto diferentes estrategias con objeto de mejorar la actividad y/o estabilidad de los biocatalizadores en medios no acuosos. La mayoría de ellos se han diseñado con el objeto de prevenir la desnaturalización que se produce durante el proceso de deshidratación (liofilización). Con este fin se ha utilizado la adición de azúcares o polímeros como el polietilenglicol (Dabulis & Klivanov, 1993b; Lamare et al., 1992) y sales inorgánicas (Knmelnitsky *et al.*, 1994) a las disoluciones previas a la liofilización. Se cree que los primeros pueden proteger durante el proceso de desnaturalización mientras que las sales inorgánicas pueden disminuir la agresión directa del disolvente.

Otro método utilizado para aumentar la actividad enzimática ha sido la adición de pequeñas cantidades de agua (Bell, *et al.*, 1995), lo cual aporta lubricación y flexibilidad suficientes para mejorar la catálisis. En otras ocasiones, la adición de cosolventes desnaturalizantes (Almarsson & Klivanov, 1996) o de disoluciones que mimetizan el agua al disolvente orgánico han dado lugar a incrementos en la actividad enzimática de hasta tres órdenes de magnitud.

Otras estrategias que incrementan la actividad enzimática consisten en el aumento de la estabilidad del enzima, como son la inmovilización en soportes de diferente naturaleza (Clark, 1994), que además de reducir los procesos de agregación, facilitan la recuperación y la reutilización del enzima. También se aumenta la estabilidad mediante la formación de cristales entrecruzados de enzimas (Clair *et al.*, 1992). Una mayor estabilidad puede también conseguirse por ingeniería de proteínas realizando mutaciones puntuales, cambiando residuos polares por otros de naturaleza hidrofóbica en la superficie del enzima de modo que originen enzimas mas estables en medios no acuosos (Pantoliano, 1992). La modificación de su superficie mediante anfífilos (Inada *et al.*, 1995) o

su recubrimiento con surfactantes ('surfactant-coated' enzymes) (Okahata & Toshiaki, 1997) es otro método que produce aumentos en la actividad catalítica del enzima al aumentar su solubilidad en medios no convencionales.

Recientemente se ha explorado la posibilidad de modular centros activos de enzimas, optimizando así la actividad catalítica en disolvente orgánico. Esta técnica llamada (bio)impresión molecular ('molecular (bio)imprinting'), explota la 'memoria de ligando' que poseen los enzimas en medios no convencionales. La impresión molecular ha sido aplicada tanto a proteínas no enzimáticas como a enzimas. Así la impresión molecular de proteínas no enzimáticas ha permitido la generación de nuevos adsorbentes bastante específicos para su uso en medios de bajo contenido en agua (Braco *et al.*, 1990; Braco, 1995), proponiéndose también para separaciones cromatográficas en fase orgánica (Dabulis & Klibanov, 1993a). La aplicación de esta estrategia se ha extendido también a varias proteasas (Russell & Klibanov, 1988; Ståhl *et al.*, 1991; Rich & Dordick, 1997) y a deshidrogenasas (Johansson *et al.*, 1995). El razonamiento de la estrategia es conceptualmente similar y está basado en la generación de un cambio conformacional inducido sobre la proteína por un ligando en disolución acuosa, el cual posteriormente es 'congelado' por liofilización. El ligando actúa como molécula impresora pudiendo ser desde un inhibidor competitivo a un cofactor. Posteriormente, el polvo de enzima liofilizado, previa eliminación del ligando por sucesivos lavados, conservará la conformación inducida por el ligando debido a la alta rigidez conformacional. De este modo, la proteína recuerda la interacción que tuvo con el ligando ('memoria de ligando') obteniéndose así proteínas que unen con mas afinidad el ligando en el caso de adsorbentes, y a enzimas mas activos y/o con diferente selectividad. Además, con esta estrategia es posible diseñar enzimas mas activos y adsorbentes mas específicos frente a sustratos o ligandos artificiales. La explicación a nivel molecular de estos resultados es una cuestión abierta a debate (Klibanov, 1995; Yennawar *et al.*, 1995), aunque evidencias estructurales recientes, obtenidas con FTIR, demuestran la existencia de cambios conformacionales inducidos por ligandos en proteínas impresas (Mishra *et al.*, 1996; Rich & Dordick, 1997).

En este contexto, debido a la importancia que las lipasas tienen en las biotransformaciones en medios no convencionales, recientemente se ha explorado la (bio)impresión molecular en enzimas lipolíticos para mejorar su uso en aplicaciones biotecnológicas. Estos enzimas como ya se ha explicado en la primera parte de la introducción, en su medio natural desarrollan una actividad en un entorno altamente hidrofóbico debido a la naturaleza lipídica de sus

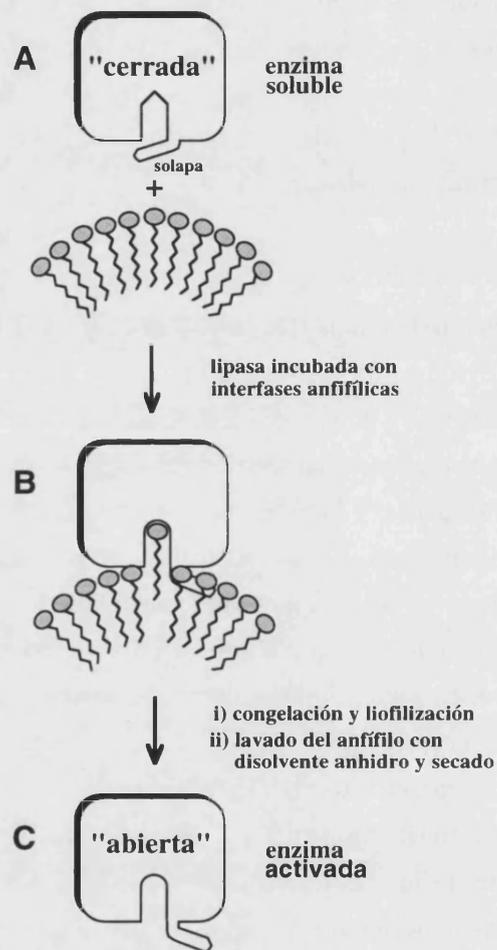
sustratos. Por este motivo y basándose en el conocimiento de su mecanismo de acción se escogieron las interfases como ligando en la aplicación de la impresión molecular. De este modo, fue desarrollada una estrategia que mejoró significativamente el uso de enzimas lipolíticas en entornos no acuosos, la cual se denominó impresión molecular basada en la 'activación interfacial' (Interfacial Activation-based Molecular (bio)Imprinting, IAMI) (Mingarro *et al.*, 1995; Braco & Mingarro, 1996).

#### *1.3.4. Impresión molecular basada en la 'activación interfacial' de enzimas lipolíticas*

Como ya se ha mencionado en la primera parte de esta introducción, la característica más relevante y peculiar de los enzimas lipolíticos, en particular de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y de las lipasas, es el aumento de actividad que experimentan cuando se encuentran frente a una interfase, la 'activación interfacial'. Los cambios conformacionales del enzima, que incluyen una mayor accesibilidad al centro activo y la inducción de una maquinaria catalíticamente más competente, pueden ser los responsables del proceso. Así, la estrategia de impresión molecular utiliza tanto la propiedad de la 'activación interfacial' como la rigidez conformacional que adquieren los enzimas en los medios con bajo contenido en agua. El razonamiento de la estrategia es el siguiente: en disolución acuosa en presencia de una interfase, el enzima experimenta los cambios conformacionales que ocurren durante la 'activación interfacial', incluyendo el reajuste de la maquinaria catalítica y la apertura de la solapa. Posteriormente el enzima es congelado rápidamente y liofilizado, atrapándose y reteniéndose la conformación última inducida por la interfase (activada), que tuvo el enzima en la disolución previa a la liofilización. El resultado del tratamiento del enzima con esta estrategia es la obtención de enzimas lipolíticos que exhiben velocidades de reacción mayores en medios no acuosos en comparación con los enzimas no tratados. El esquema (1) muestra los cambios conformacionales que se hipotetizan que se producen en la lipasa al aplicar la estrategia.

Finalmente cabe señalar que aunque la estrategia está basada en la impresión molecular de proteínas, su aplicación a enzimas lipolíticos es conceptualmente algo diferente. En el caso de las lipasas la bioimpresión molecular induce al enzima a adoptar una conformación natural dentro de su mecanismo catalítico de activación, es decir, una conformación que aunque es

mas óptima no es nueva para el enzima. El ligando no fuerza a la lipasa a adoptar una conformación o a crear una 'huella' estructural nueva, sino que



**Esquema 1. Modelo de la estrategia de impresión molecular aplicada a lipasas.** Esquema de los cambios conformacionales que se hipotetiza que experimenta la lipasa durante la estrategia de impresión molecular basada en la activación interfacial (estrategia de TPI). En A la lipasa es incubada en presencia de interfaces lo que provoca un cambio conformacional hacia una forma más abierta (B) que posteriormente es 'congelada' y retenida en disolvente orgánico (C).

simplemente cambia la proporción de confórmers abierto/cerrado. De este modo, lo que en realidad se produce es el atrapamiento de una conformación abierta, mas activa, la cual ha sido inducida por la presencia de la interfase. A lo largo del trabajo que a continuación se presenta la estrategia se ha denominado 'Atrapamiento de confórmers en Presencia de Interfases' y de forma abreviada estrategia TPI.

## 1.4. Objetivos

Dentro del marco de discusión que plantea la cuestión abierta a debate sobre la conformación de las lipasas en disolución acuosa, el trabajo que a continuación se describe, ha tenido como objeto, por un lado, esclarecer aspectos de la dinámica conformacional y mecanismo de activación de lipasas, y por otro lado, la aplicación de la estrategia de TPI, para aumentar la actividad catalítica de lipasas en medios no convencionales. En concreto se propone:

1. Un estudio bioquímico básico sobre la activación de lipasas abordándolo mediante:

a) un estudio en medio acuoso sobre la interacción de lipasas con moléculas anfipáticas de diferente naturaleza, a través del seguimiento de la actividad lipasa, tanto lipolítica como esterolítica, utilizando diferentes sustratos.

b) un estudio complementario utilizando la estrategia de TPI como herramienta para el atrapamiento de confórmeros analizando la actividad lipasa en medios orgánicos.

2. Mejorar la catálisis enzimática de reacciones de interés biotecnológico en medios no convencionales utilizando lipasas de diferentes orígenes, aplicando la estrategia de atrapamiento de confórmeros en presencia de interfases (TPI).

En ambos casos se han seleccionado lipasas cuyos mecanismos de acción y estructuras tridimensionales han sido caracterizadas ampliamente. El conocimiento de estas estructuras ha permitido realizar una interpretación molecular de los resultados obtenidos.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Materiales

Los extractos crudos de las lipasas utilizadas fueron proporcionados por diferentes casas comerciales. Las preparaciones de páncreas porcino, *Candida rugosa* (CrL) y cobaya (gpL) fueron de Sigma; las de *Geotrichum candidum* (GcL), *Rhizopus delemar* (RdL), *Rhizopus javanicus* (RjL), *Rhizopus niveus* (RnL), *Humicola lanuginosa* (HIL), *Penicillium cyclopium* (PcL), *Pseudomonas fluorescens* (PFL) y *Pseudomonas sp.* (PsL) fueron generosamente proporcionadas por Amano Co. y la de *Rhizomucor miehei* (RmL) por la casa comercial Novo Nordisk; las lipasas de *Rhizopus arrhizus* (RaL) y *Aspergillus niger* (AnL) fueron proveídas por la casa comercial Fluka. Otras proteínas, como la albúmina de suero bovino, proteasas, y el enzima acil coenzima A sintetasa de *Pseudomonas sp.*, fueron suministradas por Sigma.

Los sustratos de las lipasas el p-nitrofenilpropionato (PNP-propionato), éster butil caprilato, triglicéridos, todos los ácidos grasos e hidroxiácidos, geranilgeraniol, D,L-citronelol, ciclohexilmetanol, ciclohexanol y 1,4-bencenodiol fueron suministrados por Sigma. El (-)-mentol fue de la casa comercial Aldrich. Todos los acil derivados del coenzima A y el detergente n-octil- $\beta$ -D-glucopiranosido (n-OG) fueron suministrados por Sigma; el dodecilsulfatosódico (SDS) fue de Merck; dioctil sulfosuccinato (AOT) fue suministrado por Serva y el detergente Triton X-100 por Panreac. El emulsificante goma arábica, la sacarosa y la lactosa fueron de la casa Sigma.

Todos los disolventes orgánicos fueron de grado analítico (Merck o Panreac) o de grado HPLC (Merck o Scharlau). Cada disolvente fue desecado antes de su uso, con tamiz molecular de 3 Å (Merck) para obtenerlo anhidro. De este modo el contenido en agua del disolvente fue inferior al 1%, determinado por titulación Karl-Fisher (Laitinen & Harris, 1975).

Las sales inorgánicas como Tris, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, LiCoA, CaCl<sub>2</sub>, Hepes, MES, sulfato sódico y persulfato amónico así como la acrilamida y la bisacrilamida fueron proveídos por Sigma. Otros productos utilizados fueron suministrados por Sigma o Merck.

## 2.2. Purificación de lipasas de diferentes orígenes

Las lipasas fueron previamente purificadas para su utilización en ensayos en medios acuosos. Para los ensayos en disolvente orgánico se utilizaron directamente los extractos comerciales, excepto en el caso de la lipasa del hongo *Rhizomucor miehei* para la cual se hizo un paso previo de semipurificación.

### 2.2.1. Semipurificación de la lipasa de *Rhizomucor miehei*

La lipasa de *R.miehei* se purificó parcialmente, a partir del extracto crudo, realizando una precipitación con sulfato amónico, procediéndose del siguiente modo: por cada ml de extracto crudo se añadieron 2 ml de una disolución saturada de sulfato amónico manteniéndose en agitación durante 1 hora a 4 °C. Después de una centrifugación a 12000 rpm durante 5 min, el enzima sedimentado se resuspendió y dializó frente a tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, en una bolsa de diálisis de 16 mm de diámetro de poro (Serva). El dializado se utilizó directamente en la preparación de muestras para medios no convencionales.

### 2.2.2. Purificación de las lipasas para ensayos acuosos

En líneas generales los protocolos de purificación que se siguieron fueron los descritos por Aires-Barros *et al.* (1994). En todos los casos se partió de los extractos crudos comerciales y la purificación se llevó a cabo con objeto de realizar ensayos de actividad enzimática en medio acuoso.

#### 2.2.2.1. Lipasa de *Candida rugosa*

Para la purificación de la lipasa de *C.rugosa* se realizó sólo un paso de purificación mediante cromatografía convencional. Para ello 50 mg de extracto crudo de Sigma disueltos en 1 ml de tampón, previamente centrifugado (6000 rpm x 5 min) a 4 °C, se aplicaron en una columna (10 x 1.5 Bio-Rad) de 3.5 ml de DEAE-Sepharosa (Pharmacia) equilibrada con tampón MES 50 mM, pH 6. La columna se eluyó con el mismo tampón conteniendo un gradiente continuo de NaCl desde 0 a 0.5 M, recogiendo el eluido en fracciones de 1 ml. Las muestras conteniendo la lipasa, se concentraron mediante una célula de

ultrafiltración utilizando una membrana de 10000MWCo de Amicon Corporation. Todo el proceso se realizó a 4 °C.

#### 2.2.2.2. Lipasa de *Geotrichum candidum*

Igual que en el caso anterior la purificación se llevó a cabo mediante cromatografía convencional, a 4 °C, partiéndose del extrato crudo proporcionado por Amano Co. Una muestra de 1 ml conteniendo 100 mg de extracto crudo, centrifugado previamente (6000 rpm x 5 min) a 4 °C, se aplicó en una columna de 5 ml de DEAE-Sepharosa, equilibrada con tampón Tris-HCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 3.3 mM, pH 7.5. La columna se eluyó con un gradiente continuo desde 0 a 0.8 M de NaCl, recogiendo fracciones de 2 ml. Posteriormente, las fracciones con actividad lipasa concentradas se sometieron a cromatografía de exclusión molecular (40 x 1.5 Bio-Rad, 15 ml de Sephadex G-100, Pharmacia). La columna se equilibró y se eluyó con el mismo tampón utilizado en la cromatografía de intercambio aniónico pero sin NaCl. Las fracciones con actividad lipasa se concentraron del mismo modo que en el caso anterior.

#### 2.2.2.3. Lipasas de *Rhizopus delemar* y de *Humicola lanuginosa*

La purificación de la lipasa se llevó a cabo mediante una única cromatografía utilizando una columna de exclusión molecular de 15 ml de Sephadex G-100 equilibrada con tampón Tris-HCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 3.3 mM, pH 7.5, a 4 °C. Las muestras para la cromatografía se prepararon disolviendo 30 mg de lipasa en 300 µl de tampón. La columna se eluyó con el mismo tampón de equilibrado y se recogieron fracciones de 1 ml. Las fracciones correspondientes a la lipasa se concentraron del mismo modo que en los casos anteriores.

En todos los casos las muestras concentradas se congelaron de forma rápida con N<sub>2</sub> líquido para su uso posterior. El seguimiento de cada purificación se realizó mediante electroforesis en SDS y la actividad se ensayó mediante la hidrólisis de triglicéridos (típicamente tributirina) y la hidrólisis de ésteres de p-nitrofenilo (típicamente PNP-propionato). El contenido de cada enzima en las muestras purificadas se cuantificó por Abs a 280 nm, paralelamente a la determinación por electroforesis en gel discontinuo en SDS teñido con azul Coomassie R-250, llevada a cabo como se describe en el apartado 2.5. El densitometrado de las correspondientes bandas de la electroforesis se llevó a cabo con un densitómetro LKB 2202 Ultrosan laser y BSA como proteína estandard.

## 2.3. Estudio de la actividad lipasa en medios no convencionales

### 2.3.1. Preparación de muestras

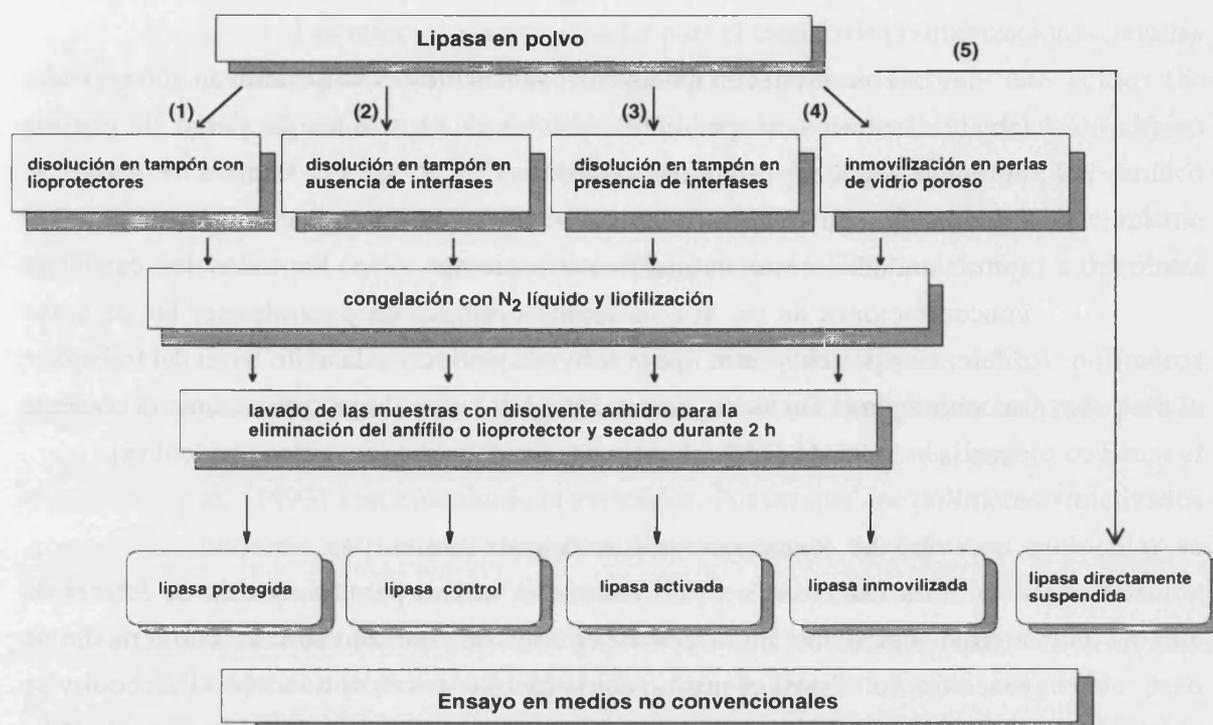
En el Esquema 2 se muestran los diferentes métodos utilizados para la preparación de la lipasa para su uso en medios no acuosos. En los métodos 1-4 esquematizados, la lipasa fue incubada en tampón con el pH óptimo de actuación del enzima, Tris-HCl 10 mM pH 7.5, previamente a su liofilización. Con esta incubación se obtiene, típicamente un polvo de enzima con '**memoria de pH**' debido a que el enzima recuerda el último estado iogénico que tuvo, obteniéndose un enzima catalíticamente más óptimo por tener el grado de ionización necesario para una catálisis eficiente. El primer método representa la preparación de muestras en presencia de lioprotectores, sales inorgánicas o azúcares (1), para obtener muestras '**protegidas**' frente a la posible desnaturalización del proceso de liofilización.

El protocolo de **activación de lipasas** (3) mediante la estrategia de TPI, fue análogo al previamente descrito (Mingarro *et al.*, 1995). Cada lipasa se incubó durante 3-4 min en un tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 *en presencia de interfases* normalmente 30 mM de n-OG para todas las lipasas, excepto para la lipasa de *G.candidum* en la cual se utilizó AOT 6 mM como interfase. Después de esta incubación la muestra se congeló con N<sub>2</sub> líquido y liofilizó durante toda la noche (lipasa activada). Para establecer comparaciones con una lipasa no tratada con interfases, se preparó paralelamente una muestra control/no activada (método 2), para lo cual la lipasa se incubó en el mismo tampón *en ausencia de interfases*, y tratándose del mismo modo que la muestra activada.

El método 4 representa la inmovilización de la lipasa, la cual se realizó básicamente como en Braco *et al.* (1992), de la siguiente forma: se disolvió el enzima en el tampón de optimización a la concentración adecuada, posteriormente esta disolución se depositó sobre el vidrio poroso a razón de 1 µl por mg de soporte y se procedió a su congelación y liofilización.

La eliminación de los anfífilos de la lipasa activada se llevó a cabo mediante 3 lavados con benceno/etanol 90:10 (v/v), para la eliminación del n-OG, o con acetato de etilo, para la eliminación del AOT. Las otras muestras fueron tratadas del mismo modo, para poder realizar comparaciones con la muestra activada. Posteriormente las muestras fueron secadas al vacío durante 2 h, previo uso en disolvente orgánico.

En el método 5, la lipasa del extracto crudo comercial se suspendió directamente en el medio de reacción en disolvente orgánico sin liofilización previa. Por lo tanto, en este caso la lipasa, no fue optimizada en su pH.



**Esquema 2. Esquema de los diferentes protocolos de preparación de lipasas para uso en medios no convencionales.** (1) Obtención de lipasa protegida, (2) disuelta en ausencia de interfases, lipasa control (no activada), (3) disuelta en presencia de interfases, (4) inmovilizada en perlas CPG y (5) suspendida directamente en disolvente orgánico.

Cuando la estrategia se utilizó como **herramienta**, para la obtención de diferentes conformeros de lipasa, el protocolo seguido se basó en el de la obtención de la lipasa activada con n-OG, ligeramente modificado. En este caso, como se quería estudiar el efecto de la concentración de detergente en la conformación del enzima, se varió la concentración de detergente, desde 0 a 30 mM en el tampón de liofilización. Los pasos de congelación, liofilización, lavado del anfífilo y secado fueron idénticos al protocolo anterior.

La **estabilidad** en medio orgánico de las lipasas activada y no activada, fue estudiada realizando pre-incubaciones de las muestras de lipasa liofilizadas

en iso-octano anhidro. Después de diferentes tiempos de pre-incubación (desde 0 a 22 h), se ensayó la actividad residual utilizando la reacción de acidólisis.

### 2.3.2. *Ensayo de la actividad lipasa*

Las reacciones en medios no convencionales se llevaron a cabo en viales con los sustratos, suspendiendo diferentes cantidades de polvo de enzima obtenido según el protocolo descrito anteriormente. Después de sonicarse durante 10 segundos, las muestras se sometieron a agitación constante a 250 rpm, tomándose este momento como tiempo cero. En todos los casos las concentraciones de las lipasas fueron optimizadas para obtener las mayores diferencias posibles entre lipasa activada y no activada. A lo largo del trabajo se se contempla el Factor de Activación (A.F.) el cual se expresa como el cociente entre la velocidad inicial del enzima activado y la del no activado (control).

#### 2.3.2.1. Reacciones de esterificación directa

La reacción de esterificación se utilizó para la síntesis de ésteres de aromas y esencias. En un primer estudio, en n-hexano anhidro como medio de reacción, se ensayó el mismo ácido (ácido oleico) variándose el alcohol y se seleccionaron cuatro alcoholes diferentes, geraniol, geranilgeraniol, D,L-citronelol y (-)-mentol. En un segundo estudio, en tolueno anhidro como medio de reacción, se seleccionó el geraniol como alcohol y se estudió la influencia de la longitud de la cadena hidrocarbonada del ácido graso desde diez carbonos (ácido cáprico, C10) hasta dieciocho carbonos (ácido esteárico, C18). La concentración de los sustratos en ambos estudios fue de 100 mM. La reacción fue seguida mediante el análisis por HPLC de alícuotas extraídas a diferentes tiempos. En todos los experimentos la temperatura se mantuvo constante a 25 °C.

#### 2.3.2.2. Reacciones en medio libre de disolvente

El estudio de reacciones catalizadas por lipasas en medio libre de disolvente se llevó a cabo seleccionando dos reacciones modelo: (i) la esterificación directa entre ácido oleico y 1-hexanol y (ii) la transesterificación (acidólisis) entre 1-butiril caprilato y 1-hexanol, con una razón molar de sustratos 1:1. Cada muestra de lipasa se suspendió en un vial conteniendo 1.0 mmol de cada sustrato en el caso de la esterificación directa y de 1.2 mmoles de cada

sustrato en el caso de la transesterificación. La reacción se incubó a 25 °C y periódicamente se sacaron alícuotas de 10 µl para su análisis por HPLC.

#### 2.3.2.3. Reacciones de polimerización

Las reacciones seleccionadas para el estudio de polimerizaciones llevadas a cabo por lipasas fueron tres: (i) la polimerización del ácido 16-hidroxi palmítico, (ii) la del ácido 10-hidroxidecanoico y (iii) la del ácido adípico con el 1,4-bencenodiol. Las reacciones se llevaron a cabo en alcohol terc-amílico anhidro conteniendo 150 mM de cada uno de los sustratos, a 25 °C. Del mismo modo que en los casos anteriores, se extrajeron alícuotas de 5 µl a diferentes tiempos de reacción para su análisis.

Para la estimación del peso molecular medio de los polímeros sintetizados se realizó una calibración previa con la columna utilizada para la separación cromatográfica (Ultrastyrigel 1000 Å) del modo descrito en Binns *et al.* (1993) con standards comerciales. Puesto que los polímeros sintetizados tuvieron estructuras similares, las diferencias de volumen molecular se correspondieron con las diferencias de peso molecular, existiendo una relación logarítmica lineal entre la longitud de cadena y el tiempo de retención. De este modo los polímeros sintetizados fueron clasificados en rangos de peso molecular mediante standards comerciales de diferentes polímeros (polietilenglicol y poliestireno de diferentes pesos moleculares).

#### 2.3.2.4. Reacciones de acidolisis con triglicéridos

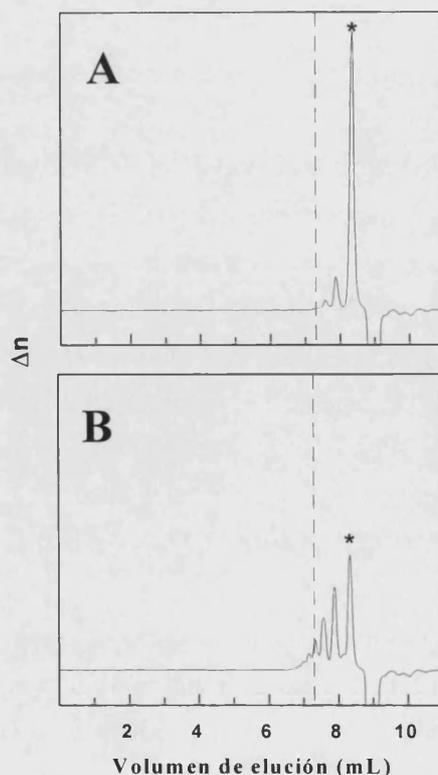
Para el estudio de la acidolisis de triglicéridos se seleccionaron especies moleculares puras de triglicéridos con diferentes longitudes de cadena acilo (desde tributirina, TGC4, hasta triestearina, TGC18) y ácido oleico como ácido graso. Se tomó como tiempo cero el momento de suspensión de una cantidad dada de lipasa en iso-octano anhidro conteniendo los sustratos, 10 mM de triglicérido y 50 mM de ácido oleico. La muestra se incubó en estufa a 40 °C y el análisis de la mezcla de reacción se realizó del mismo modo que en el caso anterior.

### 2.3.3. Seguimiento y análisis de las reacciones por HPLC

Todas las reacciones llevadas a cabo en medios no convencionales fueron analizadas por HPLC. Las diferentes alícuotas extraídas a diferentes tiempos de reacción, con los sustratos y productos así como el enzima, fueron

centrifugadas a 12000 rpm durante 3 min para la sedimentación de la lipasa. En algunos casos las muestras fueron tratadas, previamente a la centrifugación, con el fin de optimizar el análisis cromatográfico. Así, en las reacciones libres de disolvente, las alícuotas tomadas desde el medio de reacción se resuspendieron en 50  $\mu$ l de eluyente de cromatografía, antes de su centrifugación. En las reacciones de acidólisis con triglicéridos de cadena corta se realizó la evaporación del medio de reacción, mediante  $N_2$  gas, de las alícuotas tomadas a diferentes tiempos, resuspendiéndose las muestras en eluyente de cromatografía. Posteriormente, se inyectaron, entre 7 y 15  $\mu$ l (según el caso) del sobrenadante para su análisis cromatográfico.

El equipo de cromatografía (Waters) consistió en un sistema de administración de disolventes M-510, un controlador automático de gradientes, un inyector universal U6K y un detector de índice de refracción 410. Se utilizó una columna de fase inversa Licrospher 100 RP-18 (Merck), la cual fue eluída isocráticamente con una fase móvil característica dependiendo de la reacción analizada. La fase más óptima para la separación de los sustratos y productos en las reacciones de acidólisis de triglicéridos de cadena larga fue acetonitrilo/diclorometano/tetrahidrofurano/ácido acético, 70:22:20:8 (v/v/v/v) y metanol para los de cadena corta. En el análisis del resto de las reacciones, esterificaciones directas y transesterificación, se utilizó generalmente metanol.



**Figura 3. Perfiles de elución cromatográfica** Separación cromatográfica obtenida con la columna Ultrastaygel 1000 Å de los productos de la reacción de polimerización del ácido 10-hidroxidecanoico en alcohol terc-amílico a dos tiempos de reacción diferentes (A) 4 h y (B) 27 h, mediante la lipasa de *R.javanicus*. (\*) corresponde al pico de sustrato.

Para la separación de las especies obtenidas en las reacciones de polimerización se utilizó una columna de exclusión molecular, Ultrastyrigel 1000 Å, eluída con tetrahidrofurano. En la Figura 3 se muestran los perfiles de elución correspondientes a la separación de los diferentes polímeros, a dos tiempos diferentes de la reacción de polimerización, obtenidos utilizando la columna de Ultrastyrigel. La desaparición de sustrato(s) y la aparición de producto(s) fue seguida simultáneamente para el cálculo de las velocidades iniciales de la reacción.

## **2.4. Estudio de la actividad lipasa en medio acuoso**

### *2.4.1. Ensayo y seguimiento de la actividad lipasa*

La actividad lipasa en tampones acuosos se ensayó con tres tipos diferentes de sustratos: (i) PNP-propionato, (ii) triglicéridos y (iii) lipoproteína artificial. Para ello se utilizaron tanto técnicas espectroscópicas como ensayos de valoraciones volumétricas.

(i) La hidrólisis del PNP-propionato se siguió mediante un ensayo espectrofotométrico utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV 160. El ensayo se realizó a 25 °C en 1ml de tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7.5 con una concentración de sustrato de 0.25 mM y tomando como inicio de la reacción la adición de una alícuota de enzima (25 µl). Los sustratos se prepararon como disoluciones concentradas de acetonitrilo debido a su baja solubilidad, de manera tal que la concentración final de éste no fuera superior al 1%, no afectando de este modo a la actividad de la lipasa. Para compensar la hidrólisis espontánea del éster, las cinéticas se midieron como la diferencia entre la cubeta de reacción y la cubeta blanco, conteniendo esta última la misma concentración de sustrato que la cubeta de reacción. La velocidad inicial se siguió midiendo la formación de p-nitrofenol a través del aumento de absorbancia a 400 nm (coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol:  $16000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

(ii) La hidrólisis de triglicéridos fue seguida potenciométricamente con un sistema de pH-stat Crison MicroTT 2050. Para la emulsificación de los sustratos se utilizó goma arábiga y Triton X100. La tributirina (TGC4) a concentración 100 mM se preparó como emulsión con un 2% de goma arábiga. Los triglicéridos de cadena larga a concentración 15 mM, desde la tricaprina (TGC10) hasta la triestearina (TGC18), se prepararon con Triton X-100 con una

relación molar detergente:sustrato 1:5. Para los experimentos con triacetina (TGC2) por debajo de su punto de saturación (200 mM), no se utilizaron emulsificantes, presentándose como disolución isotrópica. Los ensayos se realizaron en una cubeta termostatzada a 27 °C en 5 ml de tampón Tris-HCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 10 mM, pH 7.5 ó 8.0 y con diferentes concentraciones de sustrato dependiendo del tipo de experimento. Del mismo modo que en el ensayo anterior, se tomó como tiempo cero el momento de la adición del enzima a la mezcla de reacción. Durante la reacción, la disolución se mantuvo en agitación constante y la valoración del ácido liberado se realizó con NaOH entre 30 y 50 mM. La reacción se siguió mediante el aumento de volumen de NaOH añadido.

(iii) La hidrólisis de la lipoproteína artificial se siguió mediante un ensayo turbidimétrico. La preparación de la lipoproteína se realizó según el protocolo previamente descrito por Sugihara *et al.* (1986). Se incubó 1 ml de una disolución de albúmina de suero bovino al 5% en agua destilada con 40 µl de una emulsión de aceite de oliva durante 30 min a 30 °C. La emulsión de aceite de oliva se preparó mezclando 97 µl de aceite y 1 ml de goma arábiga al 2% en agua destilada manteniéndose la mezcla en baño de sonicación durante 30 min. Los ensayos se realizaron mezclando 200 µl de la disolución de sustrato y 800 µl de tampón Tris-HCl 200 mM, pH 7.6, tomándose como tiempo cero el momento en que la lipasa se añadió a esta disolución. La reacción se siguió por el descenso de turbidez a 660 nm partiendo de una absorbancia inicial comprendida entre 0.9-1.2.

#### 2.4.2. Estudio de la influencia de *n*-octil-β-D-glucopiranosido y acilderivados del coenzima A en la actividad de la lipasa

La influencia de moléculas anfipáticas en la actividad lipasa se llevó a cabo añadiendo al medio de reacción diferentes concentraciones del detergente *n*-octil-β-D-glucopiranosido (*n*-OG) o bien de los acil derivados del coenzima A. La actividad fue ensayada utilizando como sustratos PNP-propionato 0.25 mM y triacetina 200 mM, sin emulsificantes en el medio, y en las condiciones de ensayo descritas anteriormente. Para ver la influencia del detergente en la actividad lipasa se utilizó también la hidrólisis de la lipoproteína artificial siguiendo el protocolo descrito previamente.

Para los experimentos de **pre-incubación con n-OG** se utilizó una concentración de 30 mM *n*-OG (superior a la c.m.c.) y ésta se llevó a cabo

utilizando diferentes lipasas, manteniendo la mezcla de incubación durante 10 min a 25 °C en el tampón de ensayo acuoso. Después de este período, se ensayó la actividad hidrolítica añadiendo alícuotas de 25 µl ó 10 µl del pre-incubado, según el caso, al medio de ensayo (1 ml) con el sustrato. La actividad enzimática se ensayó utilizando como sustratos PNP-propionato (0.25 mM), triacetina (200 mM) y lipoproteína artificial. A la lipasa pre-incubada con n-OG y posteriormente diluida se le llamó lipasa pre-incubada (PI). Paralelamente se ensayaron dos controles. El primer control, lipasa control (C), se incubó simplemente en tampón en las mismas condiciones pero sin n-OG. El segundo control, lipasa directa 0.75 mM (D), se incubó del mismo modo que el primer control, pero la actividad se ensayó en presencia de 0.75 mM de n-OG. Este control directo se hizo con objeto de descartar la posible influencia del n-OG restante después de diluir la alícuota de lipasa pre-incubada en el medio de ensayo. En ambos controles la actividad se ensayó del mismo modo que en la lipasa pre-incubada.

La **evolución en el tiempo** de la actividad después de la dilución fue estudiada del siguiente modo: las tres lipasas control (C), directa (D) y pre-incubada (PI) se diluyeron 40 veces (25 µl en 1 ml, volumen final) en el tampón de ensayo pero sin contener el sustrato, y a diferentes tiempos se ensayó la actividad con PNP-propionato 0.25 mM. En ningún caso la concentración final de n-OG fue mayor de 1 mM.

## **2.5. Estudio mediante electroforesis de la interacción lipasa-palmitoil coenzima A marcado radiactivamente**

El estudio de la interacción entre palmitoil-CoA y la lipasa se llevó a cabo con palmitoil coenzima A marcado con tritio, seguido por electroforesis y detección de la radiactividad en la banda correspondiente al enzima por fluorografía.

El protocolo seguido para la síntesis de palmitoil-CoA marcado fue el descrito previamente para la síntesis de miristoil coenzima A marcado con tritio (Towler & Glaser, 1986) con ligeras modificaciones. Brevemente, el protocolo de marcaje consiste en una reacción de acilación entre ácido palmítico marcado y una sal de litio coenzima A, utilizando como catalizador el enzima acil coenzima A sintetasa de *Pseudomonas sp.*

La **reacción** se realizó en un tampón Tris-HCl 10 mM, MgCl 5 mM, EGTA 0.1 mM, DTT 1 mM conteniendo 5 mM de ATP, 1 mM de litio

coenzima A y 0.5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$  de ácido palmítico marcado con tritio (Amersham). A la mezcla de reacción se añadieron 0.3 mU/ $\mu\text{l}$  del enzima, en un volumen total de 250  $\mu\text{l}$ . Después de 1 hora de incubación a 30 °C se procedió a la purificación de la mezcla de reacción.

Para la **purificación** del palmitoil coenzima A marcado, la muestra se aplicó en una columna C18 de fase inversa octadecil silano de 3 ml (ODS-5, 18%, Whatman), equilibrada con tampón acetato amónico 50 mM, pH 5.3. La columna se eluyó en tres pasos con diferentes concentraciones de acetonitrilo, al 10% (4 ml), 20% (4 ml) y 60% (6 ml) en tampón. El palmitoil-CoA sintetizado se recogió en el último paso y las fracciones se concentraron mediante congelación y liofilización, hasta un volumen de 200  $\mu\text{l}$ . La síntesis y la purificación fueron controladas mediante cromatografía en capa fina. Para ello diferentes cantidades del palmitoil coenzima A concentrado se aplicaron en una placa de sílica gel 60 (Merck) junto con patrones marcados con tritio y la placa se desarrolló con una fase móvil de composición cloroformo/metanol/agua 47.5/40/12 (v/v/v). La exposición y revelado de las marcas radiactivas se realizaron del mismo modo que en el caso de las electroforesis.

En el estudio de interacción entre lipasa y palmitoil-CoA, las lipasas de *G.candidum* (50 mg/ml del extracto crudo) y *R.delemar* (30 mg/ml) fueron incubadas durante 30 min con  $^3\text{H}$ palmitoil-CoA a 2.8  $\mu\text{M}$  a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron mediante electroforesis tanto desnaturizante como nativa, para lo cual las muestras fueron tratadas con o sin SDS según el caso.

La **electroforesis desnaturizante** se realizó en gel discontinuo en presencia de SDS (SDS-PAGE) según el procedimiento descrito por Laemli (1970). La composición del gel inferior fue 12 % de acrilamida, 0.4 % de bisacrilamida y la del gel superior acrilamida al 5 %, bisacrilamida 0.2 %.

La **electroforesis nativa** utilizada fue similar a la anterior en ausencia de SDS. El gel discontinuo se preparó con una composición del 7.5 % de acrilamida, 0.4 % bisacrilamida y la del gel superior acrilamida 5 %, bisacrilamida 0.2 %.

Todas las muestras se aplicaron por duplicado en el gel, con el fin de obtener el análisis electroforético por duplicado y proceder al secado y revelado de una parte del gel paralelamente a la tinción de la otra con azul Coomassie R-250.

Las otras mitades de ambos geles, fueron sometidas a tratamiento para llevar a cabo la fluorografía (Bañó *et al.*, 1998). Los geles fueron incubados con

dimetilsulfóxido (DMSO) durante media hora en agitación suave, 2 veces. Posteriormente, se incubaron durante 3 horas con una disolución de 2,5-difeniloxazol (PPO) al 22.5 % en DMSO. Se lavaron 2 veces con agua destilada y se secaron a 60 °C. Los geles secos, se expusieron a -80 °C, frente a una película fotográfica, excitada con luz roja previamente. El revelado se realizó al cabo de 30 días.



## **3. Resultados y discusión**

### **3.1. Estudio de la activación de las lipasas mediante la interacción con moléculas anfipáticas**

En esta primera parte del trabajo, se ha estudiado la interacción detergente-lipasa en medio acuoso mediante el seguimiento de la actividad enzimática, utilizando el detergente neutro n-octil- $\beta$ -D-glucopiranosido (n-OG), y la estrategia de TPI como herramienta en el estudio conformacional. Partiendo de la hipótesis de que el aumento de actividad de la lipasa observado en disolvente orgánico mediante la estrategia de TPI se debe a un cambio de conformación que experimenta la lipasa en el tampón de liofilización (Mingarro et al., 1995) se consideró oportuno profundizar en el estudio del efecto del detergente en la conformación del enzima. Teniendo en cuenta la estructura anfifílica del detergente, se realizó también un estudio con un grupo de moléculas de carácter anfipático, los acilderivados del coenzima A. Para esta parte del trabajo se han escogido las lipasas de hongos por dos motivos. Por una parte, por la gran utilidad que tienen estas lipasas en las biotransformaciones de interés comercial y por lo tanto el conocimiento de su mecanismo de activación puede ser muy interesante, y por otra parte porque se ha descrito que estas lipasas poseen un mecanismo de activación más simple que el de las lipasas pancreáticas de mamífero, al no necesitar de colipasa.

#### **3.1.1. Estudio de la influencia del n-octil- $\beta$ -D-glucopiranosido en la actividad lipasa**

##### *3.1.1.1. Estudio de la interacción entre la lipasa y el n-octil- $\beta$ -D-glucopiranosido en tampón acuoso*

3.1.1.1.1. Efecto directo de la interacción en la actividad esterolítica y lipolítica

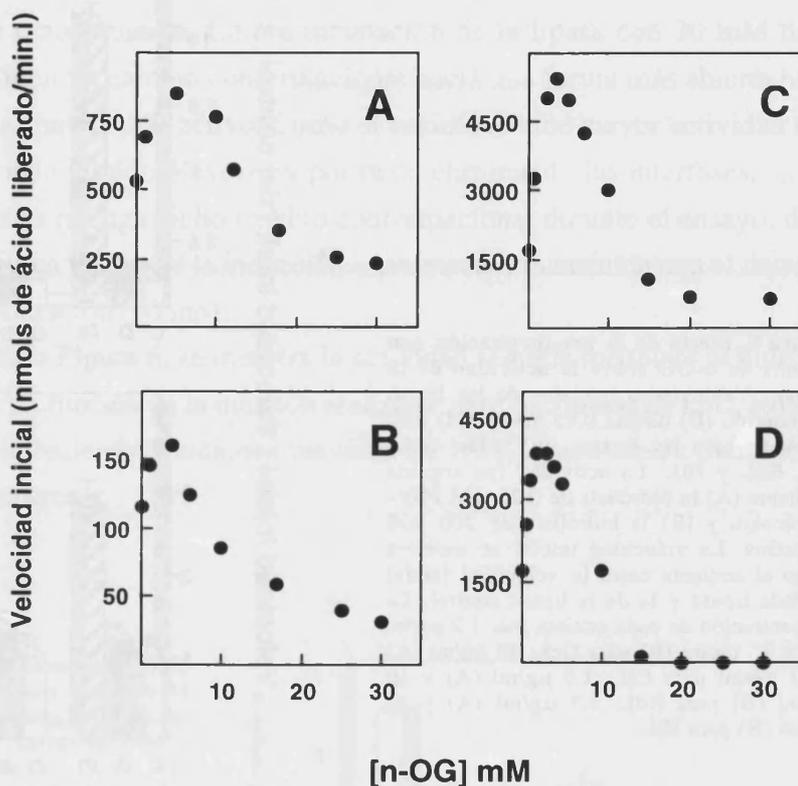
El efecto directo del n-OG se estudió analizando tanto la actividad lipolítica como esterolítica de las lipasas, escogiéndose como sustratos la

triacetina y el PNP-propionato. Los sustratos se eligieron por su alta solubilidad en tampón acuoso para no introducir emulsiones en el medio de ensayo. Para este fin, la triacetina se utilizó a una concentración de 200 mM, por debajo de su punto de saturación (318 mM, Verger, 1997). A esta concentración la triacetina se presenta como disolución isotrópica, la cual consiste en micelas y pequeños agregados. El PNP-propionato a concentración 0.25 mM fue totalmente soluble en las condiciones de ensayo utilizadas. Por otro lado, las concentraciones de cada lipasa fueron optimizadas para que la cinética fuera lineal durante el ensayo.

En la Figura 4 se muestran las velocidades iniciales para tres lipasas diferentes (RdL, CrL, GcL), en función de la concentración de detergente. Como puede observarse, en los cuatro casos y tanto para la actividad lipolítica medida con triacetina (A,B) como esterolítica medida con PNP-propionato (C,D), el efecto directo del detergente a altas concentraciones fue inhibitorio. Este resultado nos parece indicar que el efecto del detergente es general y que además debe de interactuar en las proximidades del centro activo. Sin embargo, a bajas concentraciones de detergente se observó un incremento tanto en la actividad esterasa como lipolítica. Debido a que ambos sustratos son solubles y están a una concentración bastante alejada de la necesaria para producir activación interfacial en la lipasa, este aumento de actividad observado podría ser consecuencia de un cambio en la conformación de la lipasa, inducido por el detergente. Como puede observarse al comparar ambas actividades (esterolítica y lipolítica), el incremento producido fue mayor con PNP-propionato que con triacetina. Esto podría justificarse teniendo en cuenta que aunque la triacetina a 200 mM se encuentra por debajo de su punto de saturación durante el ensayo, en realidad está como disolución isotrópica en la cual coexisten algunas micelas o agregados. Por este motivo, la lipasa durante el ensayo podría estar ya parcialmente activada por el sustrato, dando lugar a una lipasa menos susceptible de ser activada por el detergente.

El mismo efecto de inhibición con n-OG se ha descrito para la lipasa de páncreas porcino, encontrándose que la inhibición se debe a la interacción del detergente en el centro activo (Hermoso *et al.*, 1996). Los autores utilizan una emulsión de triglicéridos como sustrato y atribuyen el aumento de actividad observado a una solubilización de la emulsión producida por el detergente a bajas concentraciones. En nuestro caso no existen emulsiones en el medio de ensayo, por lo que la lipasa no está activada por interfase, y en principio, podría ser inducida hacia una conformación más activa. No obstante, no puede descartarse la posibilidad de que esta activación a bajas concentraciones, se deba

a un efecto de solubilización del sustrato. En el caso particular del PNP-propionato, este efecto es menos probable no sólo por la baja concentración a la que se utiliza durante el ensayo, sino también porque el medio de reacción contiene un 1% de acetonitrilo el cual mantiene el sustrato más soluble.



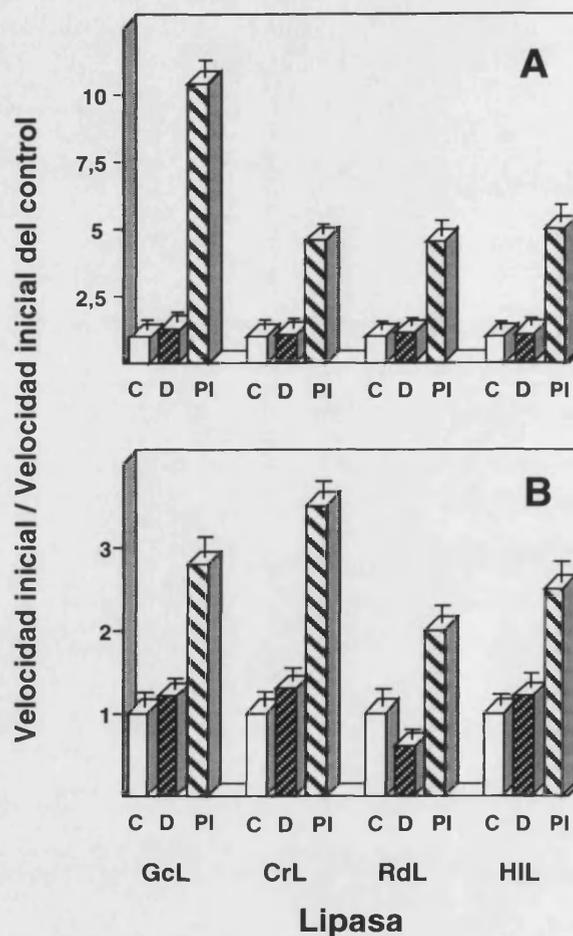
**Figura 4. Actividad de la lipasa en función de la concentración de n-OG.** Los paneles A y B muestran la actividad lipolítica en tampón acuoso para las lipasas de CrL (13  $\mu\text{g/ml}$ ) y GcL (16  $\mu\text{g/ml}$ ) respectivamente, utilizando como reacción la hidrólisis de triacetina 200 mM. En los paneles C y D se muestra la actividad esterolítica de RdL (1.0  $\mu\text{g/ml}$ ) y GcL (1.2  $\mu\text{g/ml}$ ) respectivamente utilizando como sustrato 0.25 mM PNP-propionato.

#### 3.1.1.1.2. Pre-incubación de la lipasa con detergente. Efecto de memoria

Como el efecto directo del n-OG a concentraciones mayores de 10 mM, produjo una inhibición enzimática se realizó un experimento pre-tratando la lipasa con micelas de detergente, ensayando posteriormente la actividad en disolución acuosa. Para ello cuatro lipasas (GcL, CrL, RdL y HIL) se pre-incubaron en tampón acuoso con 30 mM de n-OG durante 10 minutos.

Después de este período de tiempo, se tomaron alícuotas, diluyéndose 40 veces cada una para ser ensayadas, quedando de este modo una concentración final de detergente de 0.75 mM. Las alícuotas de enzima pre-incubado, diluidas en tampón se ensayaron con PNP-propionato y triacetina.

**Figura 5. Efecto de la pre-incubación con 30 mM de n-OG sobre la actividad de la lipasa.** Velocidades iniciales de las lipasa (C) control, (D) directa 0.75 mM y (PI) pre-incubada para las lipasas utilizadas, GcL, CrL, RdL y HIL. La actividad fue seguida mediante (A) la hidrólisis de 0.25 mM PNP-propionato y (B) la hidrólisis de 200 mM triacetina. La velocidad inicial se muestra como el cociente entre la velocidad inicial de cada lipasa y la de la lipasa control. La concentración de cada enzima fue: 1.2 µg/ml (A) y 16 µg/ml (B) para GcL; 45 ng/ml (A) y 13 µg/ml para CrL; 1.0 µg/ml (A) y 10 µg/ml (B) para RdL; 2.3 µg/ml (A) y 12 µg/ml (B) para HIL.

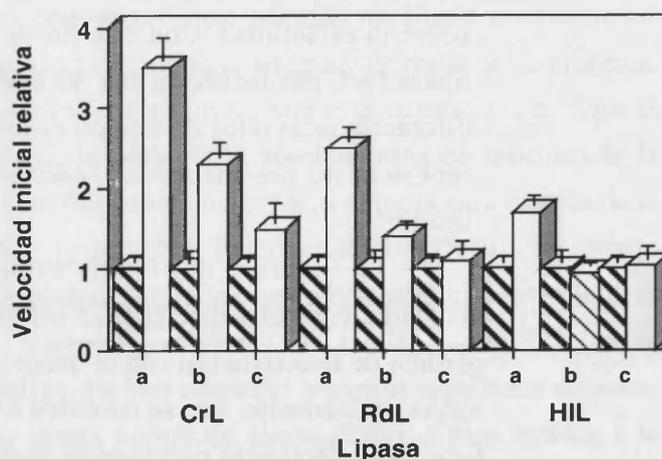


La Figura 5 muestra el efecto de la pre-incubación sobre la actividad esterolítica (PNP-propionato 0.25 mM, panel A) y sobre la actividad lipolítica (triacetina 200 mM, panel B) para las cuatro lipasas. En todos los casos se observó que las muestras pre-incubadas con n-OG (PI) presentan mayor actividad que las no pre-incubadas (C) tanto en el ensayo esterolítico como lipolítico. Para descartar la posibilidad de que la activación observada fuera debida a la presencia de n-OG remanente después de la dilución, se ensayaron también muestras de enzima sin pre-incubación previa, en presencia de 0.75 mM de n-OG control 'directo' (D). Cabe señalar que en las tres muestras, control, directa y pre-incubada, la concentración final de lipasa fue la misma. Como se muestra en la Figura 5, en

ningún caso el control directo alcanzó la actividad obtenida con la lipasa pre-incubada, siendo esta 10 veces mayor como en el caso de la lipasa de GcL en el ensayo del PNP-propionato (Fig.5 A). Por tanto, la activación parece que es debida a la pre-incubación con 30 mM de n-OG. La activación observada con triacetina fue menor (Fig.2 B), quizá debido a la presencia del sustrato en forma de solución isotrópica. Al fenómeno de activación observado después de la pre-incubación realizada con detergente se denominó 'efecto de memoria' en base al siguiente razonamiento. La pre-incubación de la lipasa con 30 mM de n-OG puede inducir un cambio conformacional hacia una forma más abierta haciendo que el enzima sea más activo. Como el enzima exhibe mayor actividad después de haber sido diluído 40 veces y por tanto eliminando las interfases, es posible que la lipasa retenga dicho cambio conformacional durante el ensayo, de modo que el enzima 'recuerda' la inducción o interacción mantenida con el detergente a alta concentración (30 mM).

En la Figura 6, se muestra la actividad seguida mediante la hidrólisis de triacetina en función de la dilución realizada, para las lipasas de CrL, RdL y HIL. Cuando se hicieron diluciones mayores de 1/40, la activación disminuyó casi hasta desaparecer.

**Figura 6. Efecto de la dilución después de la pre-incubación de la lipasa con 30 mM de n-OG.** Velocidades iniciales relativas de la lipasa directa 0,75 mM (barras oscuras) y pre-incubada (barras blancas), para las lipasas de CrL, RdL y HIL, en función de las diluciones utilizadas: (a) 1/40, (b) 1/100 y (c) 1/300. Las velocidades iniciales relativas fueron obtenidas como el cociente entre la velocidad inicial de cada lipasa y la del control utilizando 200 mM de triacetina como sustrato. La concentración enzimática para cada lipasa fue la misma que se indica en la Figura 5 (B) en el ensayo de triacetina.



Este hecho, sugiere que se requiere una concentración mínima de detergente después de la dilución, para que se pueda retener la forma activada inducida a alta concentración. Esto se puede explicar del siguiente modo: si se eliminan por dilución las moléculas que mantienen la forma activada, el enzima vuelve a adoptar una forma menos activa, que probablemente se corresponde

con una estructura conformacionalmente más cerrada. Además, las diferencias observadas con las diferentes lipasas, pueden atribuirse a diferencias en su mecanismo de activación. Así para las lipasas de *R.delemar* y *H.lanuginosa*, al poseer solapas más flexibles, puede ser más fácil el cambio de conformación a la forma conformacional del control directo (en principio, mas cerrada).

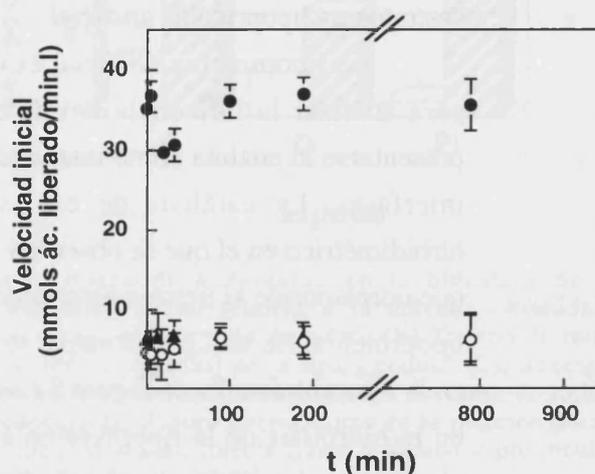
Esta hipótesis está apoyada por el estudio cristalográfico realizado por Hermoso *et al.*, (1996) en el que se describe la activación de la lipasa de páncreas porcino por micelas de detergente. Es bastante probable que esta misma activación se produzca en lipasas fúngicas, más aún teniendo en cuenta la mayor sencillez de su mecanismo de activación. Por otra parte también se ha descrito, la interacción entre una molécula de n-OG y la lipasa de páncreas en una zona muy próxima al centro activo a partir de análisis cristalográficos (Egloff *et al.*, 1996). Los autores observan que en dicho cristal la unión de la molécula de n-OG implica tanto interacciones polares como hidrofóbicas. Por tanto puede ser factible que una molécula de detergente, forzada a interactuar con el enzima, mantenga interacciones, en principio estables. Dicha suposición aplicada al efecto de memoria, sería suficiente para justificar el mantenimiento del estado activado por moléculas de detergente remanentes después de la dilución.

Si se mantiene este estado por moléculas de n-OG, cabría preguntarse cuánto tiempo podría permanecer dicha activación, lo cual podría dar una idea sobre su estabilidad. Con este fin, se llevó a cabo un experimento en el que la lipasa GcL pre-incubada con 30 mM de n-OG fue diluída 1/40 (a 25 °C) y, a diferentes intervalos de tiempo ensayada con el sustrato PNP-propionato. Las muestras no pre-incubadas (control y directo) fueron tratados del mismo modo.

La Figura 7 muestra la evolución de la actividad para la lipasa pre-incubada, control y directa 0.75 mM. En principio lo que cabría esperar es una pérdida de la activación con el tiempo, incluso en pocos minutos; sin embargo, sorprendentemente, esta se mantuvo a lo largo del intervalo de tiempo ensayado. Este estado activado permaneció hasta 13 días después de la pre-incubación y dilución. Posiblemente el enzima interacciona con el detergente de una manera suficientemente fuerte como para mantener un estado termodinámicamente estable, incluso durante 13 días a 25 °C. Otra cuestión que se plantea es por qué la lipasa directa no alcanza el mismo estado de activación, durante ese período de tiempo si hay la misma concentración de n-OG que en la muestra activada. Una posible explicación es que las moléculas remanentes de la dilución (0.75 mM n-

OG) en la lipasa pre-incubada, interaccionan con el enzima en una localización que probablemente sólo es alcanzable cuando se produce un cambio conformacional inducido por altas concentraciones de n-OG (30 mM en la pre-incubación). Es decir, en el intervalo de tiempo estudiado, las moléculas de detergente existentes en la muestra directa (0.75 mM) no son capaces por sí mismas de inducir un estado activado como el observado en la muestra pre-incubada, aunque si lo pueden mantener una vez se ha inducido el cambio mediante elevadas concentraciones de detergente (30 mM).

**Figura 7. Evolución en el tiempo de la actividad esterolítica de *G.candidum*.** Actividad esterolítica de la lipasa control (círculos vacíos), directa 0,75 mM de n-OG (triángulos rellenos) y pre-incubada (círculos rellenos) ensayada a diferentes tiempos después de la dilución. La actividad fue seguida mediante la hidrólisis de PNP-propionato 0.25 mM en tampón acuoso y la concentración de enzima 1.2 µg/ml.



El estado activado podría mantenerse además mediante interacciones entre residuos polares de la cara externa de la solapa y el resto de la proteína. Estudios recientes de modelización estructural sobre la activación de lipasas fúngicas demuestran que es más importante la desolvatación de residuos de la cara polar de la lipasa que la estabilización hidrofóbica entre la cara interna de la solapa y la interfase (Benedetti *et al.*, 1996; Peters *et al.*, 1997). En este trabajo se postula que el agua desestabiliza interacciones electrostáticas entre la cara externa de la solapa y el resto del enzima, las cuales estabilizarían la conformación abierta, más activa. En este contexto, nuestros resultados sugieren que el detergente unido a la lipasa podría de algún modo, o bien ayudar a la estabilización de la forma activada, manteniendo interacciones con el agua que de otro modo estabilizarían la forma cerrada de la lipasa, o bien favorecer la conformación abierta. Además, si se tiene en cuenta la alta labilidad conformacional que muestran las solapas de las lipasas fúngicas de *R.delemar* y *H.lanuginosa* (Derewenda *et al.*, 1994c; 1994b) sería factible que una interacción como la descrita fuera capaz de mantener el estado activado ya que

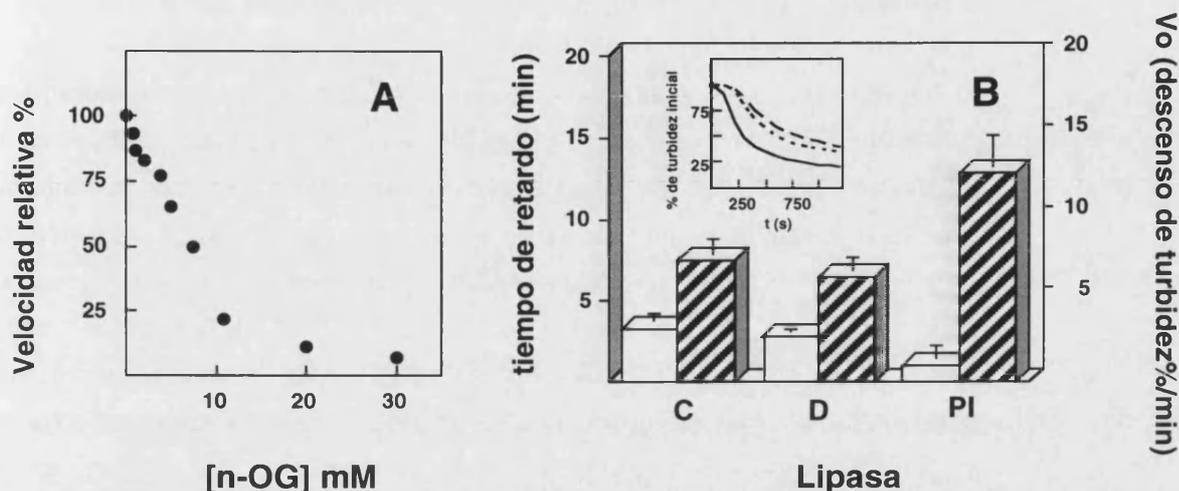
estas lipasas tienden con mucha facilidad a abrir su solapa de manera que pocas moléculas de detergente pueden ser capaces de mantener una conformación activada. En relación con esto, el tratamiento de la lipasa de *C.rugosa* con 2-propanol, origina una elevada enantioselectividad de la lipasa atribuida a la conversión de la forma cerrada a la abierta (Colton *et al.*, 1995). Esta propiedad se mantuvo durante meses a 4 °C, justificándose mediante una estabilización intramolecular inducida por el disolvente.

#### 3.1.1.1.3. Efecto del detergente en la actividad lipasa utilizando como sustrato una lipoproteína artificial

La lipoproteína artificial es un sustrato de mayor tamaño y se escogió para analizar la influencia del detergente sobre la actividad de la lipasa al presentarse al enzima como una verdadera emulsión de sustrato con numerosas interfases. La catálisis de este sustrato se siguió mediante un ensayo turbidimétrico en el que se observan claramente dos etapas. En la primera etapa, que corresponde al tiempo de retardo, la lipasa se adsorbe interfacialmente a la lipoproteína. En la segunda etapa, se produce la hidrólisis del sustrato contenido en la lipoproteína. En la Figura 8 (A) se muestra el efecto directo del detergente en la hidrólisis de la lipoproteína artificial catalizada por RdL. Como puede observarse, la adición de detergente al medio de reacción produjo una clara inhibición de la actividad. Además contrariamente a lo que ocurre con los otros dos sustratos solubles (PNP-propionato y triacetina), esta inhibición se produjo desde bajas concentraciones de detergente, no observándose la activación inicial (véase Fig.4). De manera similar a como se discutió para los sustratos solubles la interacción del n-OG en el centro activo podría explicar la inhibición observada. Por otro lado, si suponemos que el detergente a bajas concentraciones produce algún cambio en la conformación, este cambio parece que no es suficiente para ser reflejado como una activación en la catálisis de un sustrato como la lipoproteína, debido a su tamaño o a su naturaleza. Por otra parte, se observó que la inhibición producida por el aumento de la concentración del detergente fue acompañada por una reducción en la fase de retardo (resultados no mostrados).

La lipoproteína artificial también se utilizó como sustrato para el ensayo de actividad en experimentos de pre-incubación. Para ello, la lipasa de *R.delemar* se pre-incubó con n-OG 30 mM en las mismas condiciones que en el apartado anterior. Se tomaron alícuotas de 10 µl y se diluyeron en un volumen final de 1 ml de disolución conteniendo la lipoproteína artificial. Para establecer

comparaciones se realizaron los mismos controles que en el caso anterior: el control no pre-incubado y el directo no pre-incubado al cual se le añadió 0.3 mM de n-OG en el medio de reacción.



**Figura 8. Estudio cinético de la lipasa de *R.delemar* en la hidrólisis de una lipoproteína artificial.** (A) Velocidad inicial relativa a la máxima obtenida sin detergente en el medio, en función de la concentración de n-OG. (B) Tiempo de retardo (barras blancas) y velocidad inicial (barras rayadas) de la lipasa control (C), directa 0.3 mM n-OG (D) y pre-incubada (PI). La actividad se muestra como el descenso de turbidez en %/min siendo el 100% la turbidez inicial. Figura inserta: curso de la reacción para las tres muestras de lipasa, control (línea punteada), directa (línea a trazos) y pre-incubada (línea continua). La concentración de RdL fue 0.1 µg/ml.

En la Figura 8 (B) se muestran los tiempos de retardo (barras blancas) y las velocidades iniciales (barras rayadas) de las muestras control (C), pre-incubada (PI) y directa (D). La figura inserta muestra las cinéticas de las muestras control, pre-incubada y directa. El análisis de los resultados pone de manifiesto que la pre-incubación da lugar a una lipasa cuya actividad es mayor y en cuya cinética hay una reducción del tiempo de retardo. Estos resultados sugieren que la lipasa tiene mayor facilidad para adsorberse a una interfase, dando lugar a tiempos de retardo más cortos y es catalíticamente más activa, como puede observarse en la pendiente mas pronunciada. Del mismo modo que en el caso anterior, los resultados podrían interpretarse en términos de un cambio conformacional en la lipasa hacia una forma más abierta con mayor accesibilidad al centro activo y con mayor afinidad a interfases, probablemente al exhibir residuos hidrofóbicos. Sugihara *et al.*, (1986), han descrito resultados similares utilizando la misma lipasa y el mismo sustrato pero sonicando la lipasa con fosfolípidos previamente al ensayo de su actividad.

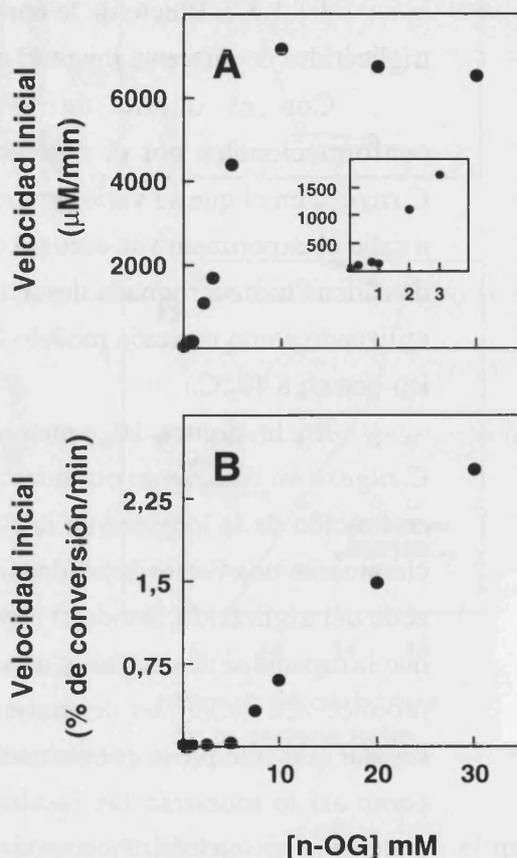
### 3.1.1.2. Estudio de la actividad de la lipasa de *Candida rugosa* mediante la estrategia de TPI. Seguimiento de la actividad en medios no convencionales

En este apartado se ha utilizado la estrategia de TPI, como herramienta para profundizar en el estudio del efecto del detergente en la actividad lipasa. Así de acuerdo con la hipótesis inicial de la estrategia, cuando se añade una interfase al tampón acuoso de la liofilización se induce en la lipasa una conformación más activa en base al cambio conformacional que experimenta el enzima en presencia de una interfase por la propiedad de 'activación interfacial'. De esta manera, durante la liofilización y el lavado del anfilo con disolvente orgánico, y posterior ensayo en medio no acuoso se retiene la conformación activada, presumiblemente más abierta, debido a la elevada rigidez conformacional exhibida por los enzimas en estos medios (Zaks & Klibanov, 1984). Teniendo en cuenta que durante el proceso se atrapa la última conformación que tuvo la lipasa en disolución acuosa, la estrategia se utilizó como método para detectar cambios en la conformación, midiendo la actividad en disolvente orgánico. Como la conformación se retiene en disolvente orgánico, la actividad reflejará el estado más o menos activado producido por el cambio conformacional inducido en el tampón acuoso previo a la liofilización. En otras palabras, la actividad reflejará el cambio de conformación que la lipasa ha experimentado en el tampón de liofilización. Para llevar a cabo esta parte del trabajo, se escogió la lipasa de *Candida rugosa*.

#### 3.1.1.2.1. Estudio de la influencia de la concentración del detergente en el tampón previo a la liofilización sobre la actividad lipasa en disolvente orgánico

La influencia de la concentración del detergente fue estudiada mediante un experimento en el que se varió la concentración de n-OG en el tampón previo a la liofilización, ensayándose posteriormente la actividad en disolvente orgánico. La Figura 9 muestra la actividad de la lipasa de *Candida rugosa* en función de la concentración de detergente (n-OG) para dos reacciones diferentes, (A) la esterificación directa entre 1-hexanol y ácido oleico en n-hexano anhidro a 25 °C y (B) la acidólisis de tributirina (TGC4) por ácido oleico en iso-octano anhidro a 40 °C. Si la lipasa sólo se activa en presencia de interfases, lo que cabe esperar es baja actividad a concentraciones por debajo de la c.m.c. del detergente (24 mM para el n-OG) al no estar activada la lipasa. Sin embargo, cuando se

analizan los resultados obtenidos con la reacción de esterificación directa (A), se observa un claro incremento de la actividad, muy por debajo de la c.m.c. del detergente, y por lo tanto una activación del enzima. La figura inserta muestra, la actividad de la lipasa a bajas concentraciones observándose claramente que la concentración a la que empieza la lipasa a activarse es realmente baja, alrededor de 1.75 mM.



**Figura 9. Influencia de la concentración de n-OG en el tampón de liofilización en la actividad de la lipasa de *C.rugosa*.** Velocidad inicial en disolvente orgánico, en función de la concentración de detergente utilizado en el tampón de liofilización, siguiendo la actividad mediante (A) esterificación directa entre 1-hexanol 100 mM y ácido oleico 100 mM en n-hexano anhidro y (B) acidolisis de tributirina 10 mM por ácido oleico 50 mM en iso-octano anhidro. Figura inserta: detalle de la velocidad inicial a bajas concentraciones de detergente. La concentración final de enzima en el disolvente orgánico fue 20 mg/ml.

En el caso de la acidolisis (B) se necesitó 7.5 mM de n-OG para detectar activación en el enzima. La comparación de los resultados obtenidos para ambas reacciones y el análisis de la concentración de detergente requerida para observar activación permite establecer algunas conclusiones sobre el efecto del detergente en la conformación de la lipasa. En primer lugar, contrariamente a lo esperado, parece que la lipasa puede activarse independientemente de la presencia de una interfase, aunque no se descarta la posibilidad de que la activación 'total' requiera interfases, o más bien emulsiones que son las especies moleculares que hasta ahora se cree que producen la activación del enzima. En segundo lugar, la concentración de detergente a la que empieza a activarse la lipasa parece ser diferente según el sustrato ensayado. De este modo, se manifiesta una

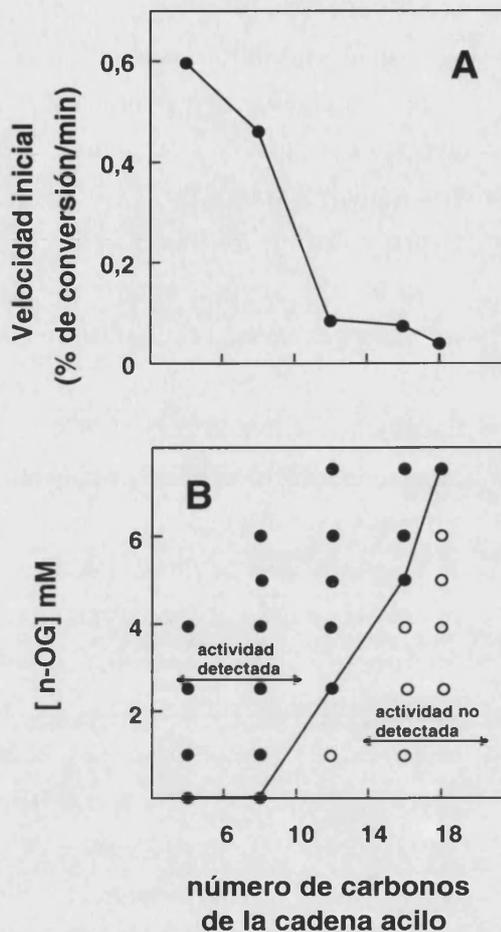
accesibilidad al centro activo dependiente del tamaño del sustrato, de manera que una conformación determinada, inducida por una concentración de detergente dada, será lo suficientemente abierta o activa dependiendo del sustrato ensayado. Así la catálisis de un determinado sustrato puede dar información sobre el estado conformacional del enzima.

#### 3.1.1.2.2. Efecto de la concentración de detergente en la actividad hacia triglicéridos de diferente longitud de cadena acilo

Con el objeto de profundizar en la inducción de estados conformacionales por el detergente, se realizó un estudio con la lipasa de *C.rugosa* en el que se varió progresivamente el tamaño del sustrato. Para llevar a cabo el experimento se escogió una serie de triglicéridos de diferente longitud de cadena hidrocarbonada desde tributirina (TGC4) hasta triestearina (TGC18) utilizando como reacción modelo la acidólisis del triglicérido por ácido oleico en iso-octano a 40 °C.

En la Figura 10, panel A, se muestra la actividad de la lipasa de *C.rugosa* en disolvente orgánico, liofilizada en presencia de 10 mM de n-OG, en función de la longitud de la cadena del triglicérido. El experimento mostró claramente una fuerte dependencia de la actividad con la longitud de la cadena acilo del triglicérido, siendo el punto crítico el TGC12. De este estudio se deduce que la capacidad de catálisis y accesibilidad al centro catalítico, incluso cuando se produce activación, es dependiente del tamaño del sustrato ensayado. Cabe señalar que, aunque la concentración de 10 mM produjo activación en la lipasa, como así lo muestran los resultados del apartado anterior, es posible que la activación no sea total. Para aportar más datos sobre la activación inducida por el detergente y la dependencia del tamaño de sustrato, se realizó un experimento en el que se varió, tanto la concentración de n-OG en el tampón previo a la liofilización como el tamaño del triglicérido. En el panel B de la misma figura se muestra un diagrama en el que se representa la actividad en función de estos dos parámetros. Los círculos rellenos indican que se detectó actividad para cada triglicérido a una concentración dada de n-OG mientras que los vacíos hacen referencia a las muestras que no dieron actividad para cada triglicérido y concentración de n-OG indicado. Del análisis de los resultados de este experimento se puede establecer que a mayor longitud de cadena es necesaria una mayor concentración de detergente en el tampón para activar el enzima. Esto significa que a mayor concentración de detergente se puede generar una conformación más abierta que es capaz de catalizar un sustrato más grande,

mayor cuanto mayor sea la concentración de n-OG utilizada en la activación.



**Figura 10. Actividad de la lipasa de *C.rugosa* en disolvente orgánico en función del triglicérido ensayado.** (A) Velocidad inicial en función de la longitud de cadena del triglicérido ensayado en la reacción de acidólisis por ácido oleico en iso-octano. Se muestra la actividad de la lipasa liofilizada desde 10 mM de n-OG. En el panel B, el diagrama muestra la actividad detectada (círculos rellenos) o no (círculos vacíos) en función de la concentración de detergente en el tampón de liofilización para cada triglicérido. La línea indica la concentración de detergente a partir de la cual se detectó actividad en función de la longitud de la cadena del triglicérido ensayado. Las condiciones de ensayo fueron las mismas que las de la Figura 6.

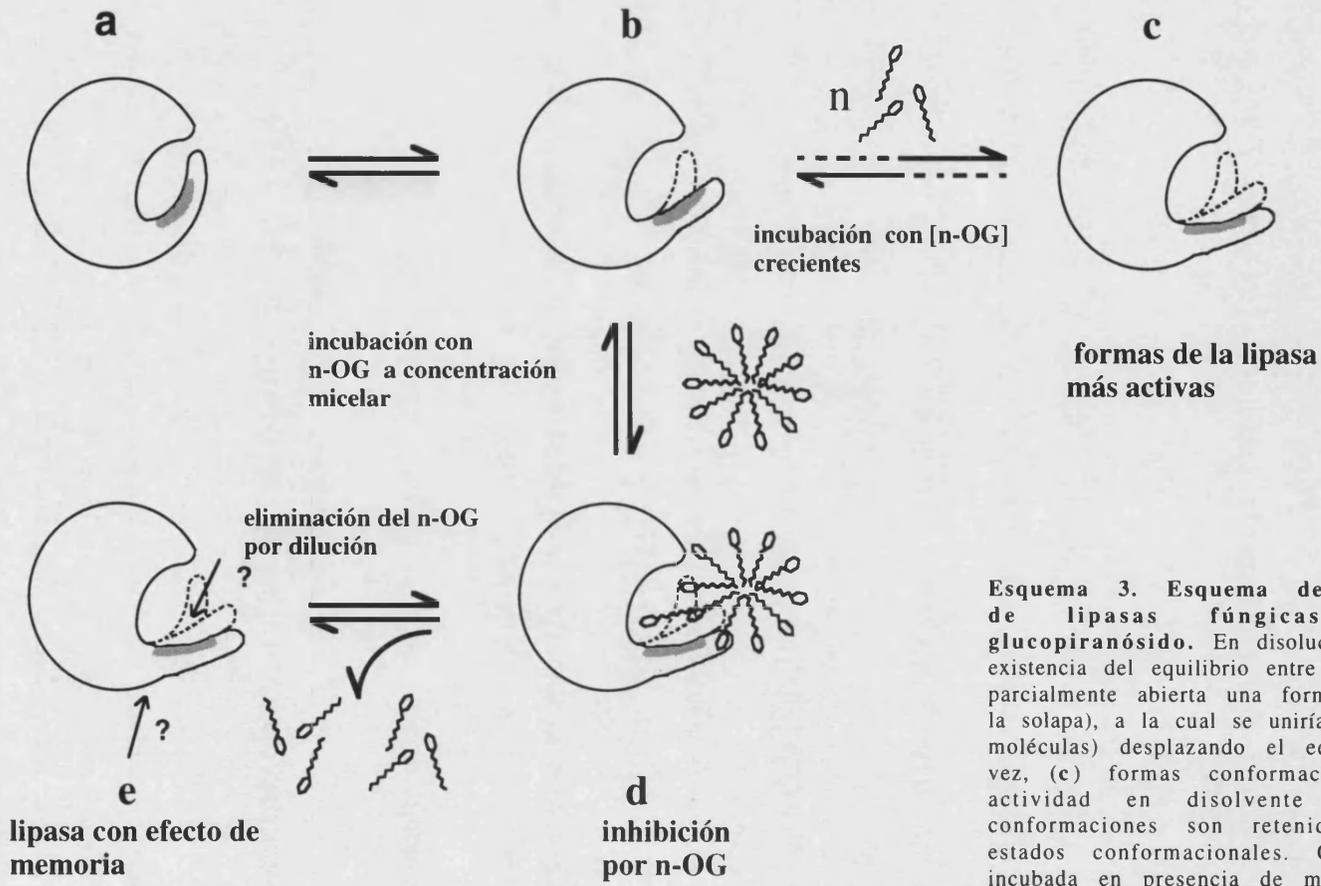
Este comportamiento podría explicarse mediante un modelo, en el que pre-existiera un equilibrio de conformeros en ausencia de detergente, uno cerrado con la solapa más cerrada, y otro más abierto con la solapa menos cerrada. La adición del n-OG provocaría un desplazamiento del equilibrio por unión preferente a la forma más abierta de manera que a mayor concentración de detergente mayor número de moléculas abiertas, lo cual explicaría el aumento de actividad (Fig.9 B), y más abiertas conformacionalmente, es decir, catalíticamente más competentes, siendo capaces de unir y transformar sustratos de mayor tamaño (Fig.10 B).

*3.1.1.3. Activación inducida por el detergente. ¿Cuántas conformaciones existen en disolución acuosa?*

A la vista de los resultados obtenidos, pueden hacerse algunas consideraciones finales sobre el estado conformacional de las lipasas de hongos y la inducción de estados conformacionales en presencia de detergentes. El detergente no sólo es capaz de producir activación sino que esta parece ser independiente de la presencia de micelas, por lo que la activación inducida por detergentes en lipasas fúngicas podría residir en una interacción tipo detergente (monómero)-lipasa. En el Esquema 3 se representa el modelo propuesto para la explicación de los resultados en el que se sugiere la pre-existencia de un equilibrio entre confórmeros abiertos y cerrados de manera que en ausencia de interfases las moléculas de detergente serían capaces de inducir, interaccionando con los confórmeros abiertos, otras conformaciones con diferentes capacidades catalíticas y diferente accesibilidad al centro activo.

Los resultados obtenidos parecen indicar que la activación de las lipasas fúngicas es más fácil de lo que en principio se creía, hecho probablemente relacionado con la flexibilidad en la solapa que exhiben estas lipasas. Si la presencia de la solapa, no es tan determinante en la accesibilidad al centro activo, una cuestión que se plantea es si su función estará más relacionada con la especificidad de sustrato más que con la accesibilidad. En los últimos años se han descrito que mutaciones puntuales en la solapa originan cambios de especificidad en las lipasas de *H.lanuginosa* y *R. delemar* (Holmquist *et al.*, 1993; Joerger & Haas, 1994). Por otra parte, la eliminación de la solapa en la lipasa de páncreas humano produce una lipasa que no exhibe 'activación interfacial' y con una actividad disminuída hacia triglicéridos, lo que sugiere que es más importante la unión de la solapa abierta al triglicérido (por su cara hidrofóbica), determinando probablemente su especificidad, que el acceso facilitado al centro activo al haber sido eliminada la solapa (Jennens & Lowe, 1994). Así mismo, se ha descrito recientemente la activación de la lipasa de páncreas porcino a través de una micela interaccionando con la colipasa, estabilizándose la forma abierta de dicha lipasa (Hermoso *et al.*, 1997). Los autores proponen que esta interacción y pre-apertura a través de una micela es esencial para su unión al sustrato, dada la naturaleza del entorno natural de la lipasa. Puesto que el mecanismo de activación de las lipasa fúngicas es más simple que el de las de mamífero, la ausencia de colipasa, podría ser compensada por una alta flexibilidad de la solapa permitiendo así una activación más fácil.

En base a las consideraciones anteriores cabe preguntarse si la tan discutida 'activación interfacial' continua siendo una propiedad fisiológica. Se ha



**Esquema 3. Esquema del modelo de interacción de lipasas fúngicas con n-octil-β-D-glucopiranosido.** En disolución acuosa se asume la pre-existencia del equilibrio entre las (a) formas cerrada y (b, parcialmente abierta una forma con cierta flexibilidad en la solapa), a la cual se unirían las moléculas de n-OG ('n' moléculas) desplazando el equilibrio y originando, a su vez, (c) formas conformacionales más abiertas cuya actividad en disolvente orgánico, donde dichas conformaciones son retenidas, reflejan los distintos estados conformacionales. Cuando la lipasa es pre-incubada en presencia de micelas de n-OG origina (d) una forma/s conformacional/es, se detecta inhibición en tampón acuoso, que luego cuando el n-OG es eliminado por dilución, (e) es retenida por interacción con las moléculas de n-OG remanentes de la dilución. Las flechas indican puntos hipotéticos en los que podría interaccionar el n-OG remanente de la dilución.

descrito que varios tipos de lípidos, tales como fosfolípidos y ácidos grasos, son capaces de producir activaciones en lipasas (Sugihara *et al.*, 1986; van Kuiken & Behnke, 1994). Uno se plantea, si en entornos naturales *in vivo* se podrían producir activaciones similares a estas para la estabilización de conformaciones catalíticamente más competentes.

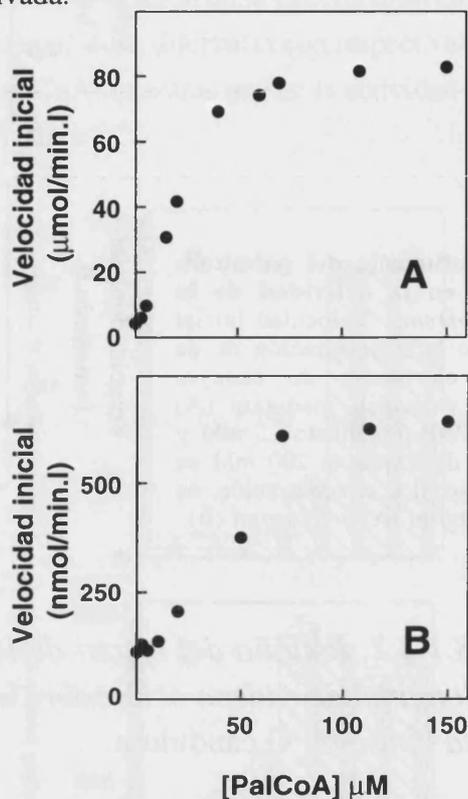
### **3.1.2. Estudio de la interacción lipasa-acilderivados del coenzima A en medio acuoso**

Los resultados obtenidos con el n-OG, planteó la cuestión de si otras moléculas anfipáticas tendrían alguna influencia en la actividad de la lipasa. Como ejemplo se escogieron los acilderivados del coenzima A (acil-CoA) para estudiar su posible papel en la activación de lipasas fúngicas. Estos derivados poseen una cabeza polar mucho más grande que el n-OG, (característica que les incapacita atravesar las membranas biológicas), lo que permite explorar la importancia de esta característica en la interacción con las lipasas fúngicas. Por otro lado, la disponibilidad comercial de una amplia gama de acilderivados permiten también analizar la influencia de la longitud de la cadena hidrocarbonada en dicha interacción.

#### ***3.1.2.1. Efecto directo del palmitoil coenzima A sobre la actividad esterolítica y lipolítica***

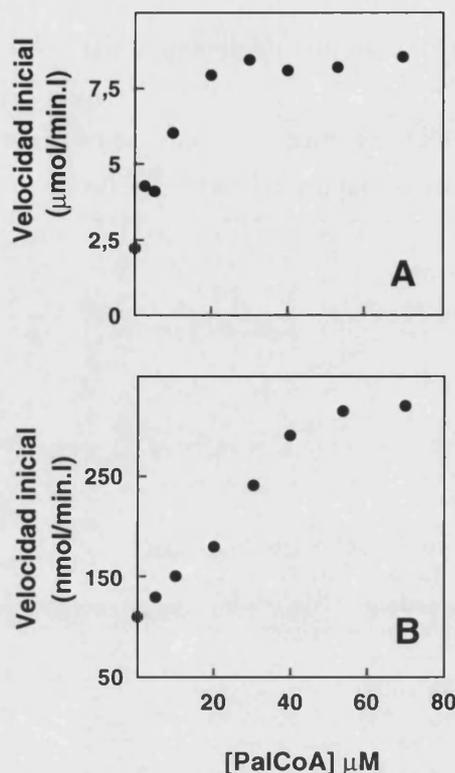
Para estudiar la influencia directa del palmitoil coenzima A (pal-CoA) se escogió la lipasa de *G.candidum* y se ensayaron las actividades lipolítica y esterolítica. En la Figura 11 se muestra la actividad con PNP-propionato (A) y con triacetina (B) en función de la concentración de pal-CoA. Como puede observarse en la figura hay un incremento en la actividad esterasa (A) de hasta 20 veces, y de unas 6 veces en la lipolítica (B), aumentando de forma gradual e independientemente de la c.m.c. del pal-CoA (42  $\mu$ M, Smith & Powell, 1986). El aumento de actividad observado en ambos ensayos se puede atribuir, en principio, a una activación debida a una interacción entre el pal-CoA y la lipasa. Esto se podría explicar suponiendo la pre-existencia de dos conformeros de lipasa (mas cerrado y menos cerrado) en ausencia de anfífilo y la unión del pal-CoA desde bajas concentraciones al conformero menos cerrado desplazando el equilibrio. Comparando este resultado con los que se obtuvieron con el detergente n-OG se pone de manifiesto la ausencia de inhibición enzimática lo

cual sugiere una incapacidad del pal-CoA de acceder al centro catalítico. Las diferencias de activación dependiendo del sustrato pueden ser atribuidas a la disolución isotrópica en el caso de la triacetina lo cual se traduciría en una lipasa menos susceptible de ser activada.



**Figura 11. Influencia del palmitoil-coenzima A en la actividad de la lipasa de *G.candidum*.** Velocidad inicial en función de la concentración de palCoA, siguiendo la actividad mediante (A) hidrólisis de PNP-propionato 25 mM y (B) hidrólisis de triacetina 200 mM en tampón acuoso. La concentración de GcL fue: 1.2 μg/ml (A) y 16 μg/ml (B).

El mismo experimento se llevó a cabo también con la lipasa de *R.deleamar*, con la finalidad de observar el efecto de la activación por pal-CoA en otra familia de lipasas fúngicas. En la Figura 12 se muestra la influencia del pal-CoA en la actividad esterasa (A) y en la actividad lipolítica (B) de dicho enzima. Igual que en el caso anterior se observó un aumento en la actividad tanto esterolítica como lipolítica. El incremento en la actividad fue menor para la lipasa de *R.deleamar* sobre todo en el caso de la actividad esterasa (4 veces) comparado con *G.candidum* (20 veces). En el caso de la actividad lipolítica esta fue de unas 3 veces. Esta diferencia puede deberse a una mayor flexibilidad en la solapa en la lipasa de *R.deleamar* (Derewenda *et al.*, 1994b; Derewenda *et al.*, 1994c) con más formas abiertas pre-existentes y por tanto menos afectada por la presencia pal-CoA.

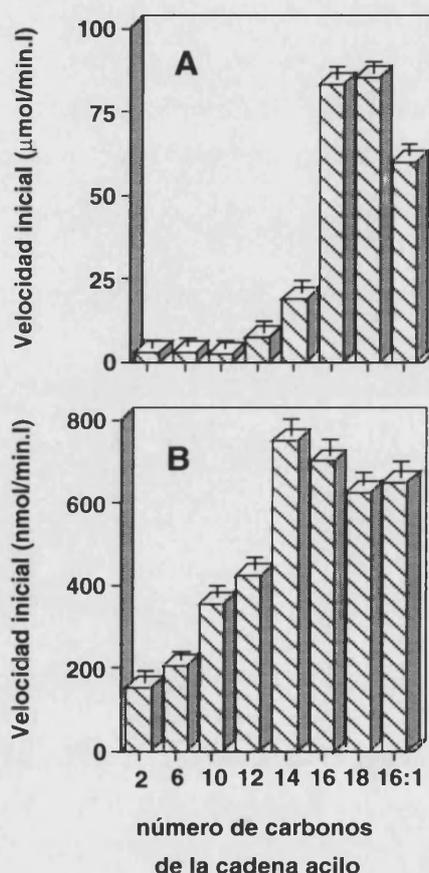


**Figura 12. Influencia del palmitoil-coenzima A en la actividad de la lipasa de *R.delemar*.** Velocidad inicial en función de la concentración de de palCoA en el medio de ensayo, siguiendo la actividad mediante (A) hidrólisis de PNP-propionato 25 mM y (B) hidrólisis de triacetina 200 mM en tampón acuoso. La concentración de RdL fue: 1.0 μg/ml (A) y 10 μg/ml (B).

### 3.1.2.2. Estudio del efecto de los derivados acil-CoA de diferente longitud de cadena acilo sobre la actividad esterolítica y lipolítica de la lipasa de *G.candidum*

Para determinar el posible papel de la cadena hidrocarbonada del acil-CoA en la activación de la lipasa se realizó un estudio con acilderivados de longitud de cadena entre 2 y 18 átomos de carbono. Cabe señalar que, en un estudio preliminar con cada derivado, la activación producida fue similar a la obtenida con el pal-CoA, es decir, fue lineal observándose desde bajas concentraciones. En la Figura 13 (A) se muestran las velocidades iniciales de la lipasa de *G.candidum* en la hidrólisis de PNP-propionato en función de la longitud de la cadena acilo de cada derivado acil-CoA, siendo la concentración de este 100 μM en todos los casos. En dicha figura se observa que la activación fue drásticamente dependiente de la longitud de la cadena hidrocarbonada del acil-CoA y además parece que sea necesaria una longitud de cadena crítica para que se manifieste la activación (a partir de 14 átomos de carbono). El aumento en la velocidad fue mas notable, con un cambio brusco entre 14 y 16 átomos de carbono, no observándose diferencias significativas entre el derivado de 16 y 18 átomos de carbono. La Figura 13 (B) muestra las velocidades iniciales en el ensayo de actividad utilizando triacetina para cada acil-CoA, a concentración 100

$\mu\text{M}$ . En este caso se detectó activación con casi todos los acilderivados, siendo el incremento más gradual con un máximo de activación cuando la cadena tiene 14 átomos de carbono. Entre los derivados se incluyó el palmitoleoil-CoA (C16:1), para estudiar la influencia de la insaturación en la cadena hidrocarbonada. En la actividad esterolítica se detectó una clara diferencia con respecto al derivado de la misma longitud de cadena (pal-CoA) mientras que en la actividad lipolítica no se observó una diferencia significativa.



Hay que señalar que para los derivados que no se detectó activación, se realizaron ensayos a concentraciones mas altas, hasta 300  $\mu\text{M}$  con el fin de hacer un barrido más amplio de concentración, analizando tanto la actividad esterolítica como lipolítica. Por otro lado, la concentración 100  $\mu\text{M}$  fue seleccionada porque a dicha concentración cada derivado produjo en la lipasa la máxima activación. En ninguno de los derivados que produjeron activación se observó cambio brusco con la c.m.c. (1130  $\mu\text{M}$  para lauril-CoA C12, 210  $\mu\text{M}$  para miristoil-CoA C14, 7.5  $\mu\text{M}$  estearoil-CoA C18; Smith & Powell, 1986) aumentando la activación de forma lineal con la concentración de acilderivado.

Las diferencias observadas entre ambas actividades no son fáciles de justificar, aunque podrían deberse a la diferencia de tamaño de ambos sustratos. En el caso de la triacetina la ausencia de una cadena crítica podría deberse a la presencia de este sustrato en forma de disolución isotrópica, de modo que los agregados/micelas existentes enmascararan el efecto activador del acil-CoA. Una explicación similar se puede extender para explicar las diferencias en ambos sustratos para el derivado acil-CoA C16:1. La insaturación hace que la cadena no esté tan extendida asemejándose a un derivado más corto lo cual indica la importancia de la longitud de la cadena en la activación. En resumen, se puede decir que la cadena hidrocarbonada parece que juega un papel importante en la estabilización de formas catalíticamente más competentes.

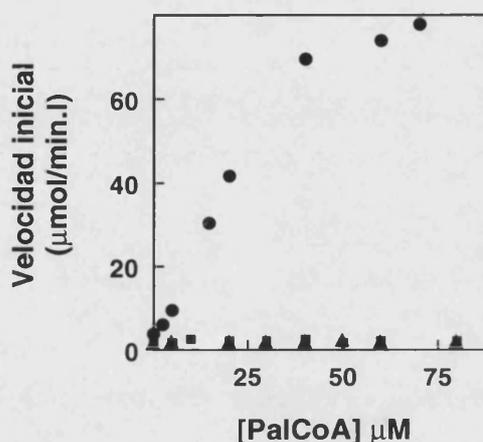
Del mismo modo que en el estudio con el detergente n-OG, no se puede descartar totalmente la posibilidad de que la activación sea debida a una solubilización de los sustratos por acil-CoA. Con objeto de esclarecer este hecho se llevaron a cabo los experimentos que se describen a continuación.

### *3.1.2.3. Efecto de los derivados acil-CoA en las actividades esterasa de la tripsina y la quimotripsina y en la actividad lipolítica de la lipasa de cobaya*

Si el pal-CoA estuviera actuando sobre el sustrato favoreciendo su solubilización y haciéndolo de este modo más accesible para el enzima, este efecto debería ser independiente del enzima utilizado y por tanto no se podría relacionar con la capacidad de activación del enzima. Para demostrar esta suposición, se realizó un experimento control en el que se ensayó la actividad de la quimotripsina y la tripsina en la hidrólisis del PNP-propionato en presencia de diferentes concentraciones de pal-CoA. En la Figura 14 se muestran las actividades esterolíticas de la quimotripsina, tripsina, y la lipasa de *G.candidum* en función de la concentración del pal-CoA en el medio de reacción. Como se puede observar la actividad no se vió alterada de forma significativa por la presencia de pal-CoA para quimotripsina y tripsina en comparación con la lipasa, por lo que en principio se puede descartar la posibilidad de que, al menos la solubilización del sustrato sea la causa principal de la activación observada. Este resultado apoya la hipótesis de que el pal-CoA podría interaccionar directamente con la lipasa induciendo formas más activas. Además cabe recordar aquí, de nuevo, que el PNP-propionato al 1% de acetotrilo en el

medio de reacción y a la concentración de 0.25 mM se encuentra totalmente soluble.

**Figura 14.** Efecto del pal-CoA sobre la actividad esterolítica de la lipasa de *G.candidum* y proteasas. Velocidades iniciales de las proteasas tripsina (cuadrados), quimotripsina (triángulos), ambas a una concentración 0.15 mg de extracto crudo/ml, y lipasa de *G.candidum* (círculos rellenos) a una concentración 1.2  $\mu$ g/ml, en la hidrólisis de PNP-propionato 0.25 mM, en función de la concentración de palCoA en el medio de reacción.

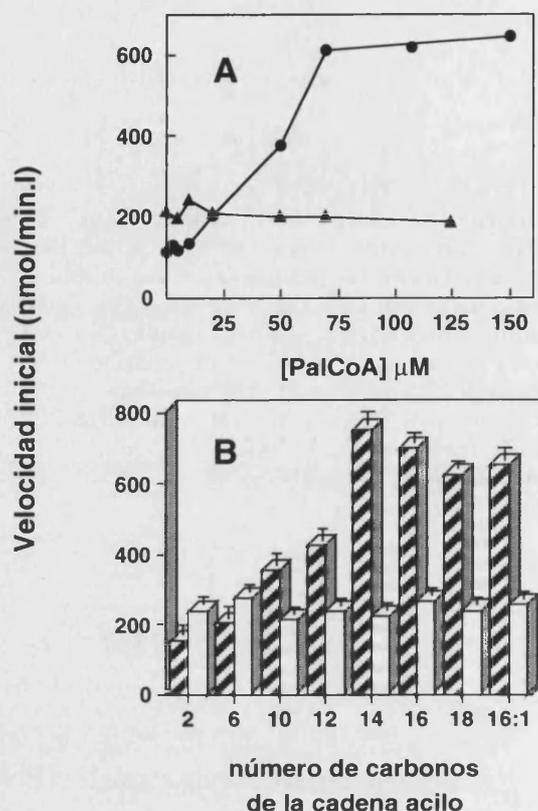


Para determinar si la capacidad de activación por pal-CoA en estas lipasas estaría de algún modo asociada con la capacidad de exhibir la 'activación interfacial' que presentan la mayoría de las lipasas, se realizó un experimento similar utilizando triacetina como sustrato y la lipasa de cobaya, la cual se ha descrito que carece de 'activación interfacial', hecho que se ha relacionado con su pequeña solapa lo cual permite una fácil accesibilidad al centro activo (Martínez et al., 1994). En la Figura 15 (A) se muestran, las actividades de las lipasas de *G.candidum* y cobaya en función de la concentración del pal-CoA. Tampoco en este caso se observó un aumento de actividad en la lipasa de cobaya sugiriendo una activación asociada a la capacidad del enzima de ser activado por una interfase. En el panel B de la misma figura se muestran las velocidades iniciales de la lipasa de cobaya utilizando el mismo sustrato, en función de la longitud de la cadena acilo del acil-CoA. Como muestran los resultados ninguno de los derivados acil-CoA produjo ninguna modificación significativa de la actividad enzimática de la lipasa de cobaya.

Además, se estudió el mismo efecto en la cutinasa no detectándose tampoco modificación de la actividad (resultados no mostrados). Este enzima está relacionado con las lipasas y no posee 'activación interfacial', atribuyéndose este hecho a la ausencia total de solapa y además al canal oxianiónico preformado que se presenta en su centro activo. Dicho canal se forma como

consecuencia de los cambios conformacionales que acompañan a la activación interfacial de las lipasas.

**Figura 15. Efecto de los acilderivados CoA en la actividad de la lipasa de cobaya.** En el panel A se muestra la actividad exhibida por las lipasa de *G.candidum* a 16  $\mu\text{g/ml}$  (círculos) y cobaya (triángulos) a una concentración 0.3 mg de extracto crudo/ml, en la hidrólisis de triacetina 200 mM en función de la concentración de palCoA. (B) Velocidades iniciales de la reacción de hidrólisis de triacetina 200 mM, en función de la longitud de la cadena del derivado acil-CoA. La concentración del derivado en el tampón de ensayo fue 100  $\mu\text{M}$ .

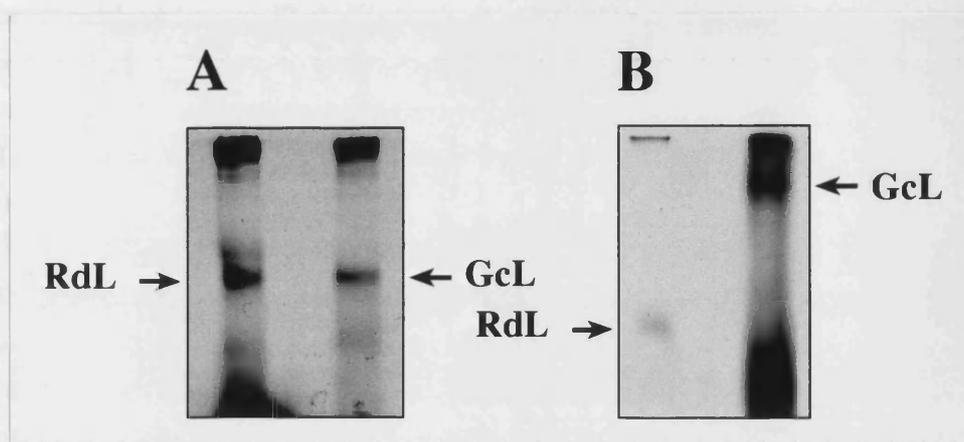


Los resultados anteriores indican que existe un paralelismo entre presencia de 'activación interfacial' y activación por pal-CoA lo cual sugiere que ambos procesos pueden generar una misma forma activada, probablemente relacionada con un cambio conformacional, hacia una forma mas activa, inducido bien por una interfase o bien por una molécula anfipática como el pal-CoA. Cabe recordar que el mismo resultado se ha obtenido con el n-OG diferenciándose del pal-CoA en que dicho detergente es capaz de inhibir la lipasa. La ausencia de inhibición que se observa con pal-CoA, puede residir en la cabeza polar, mas grande con una mayor dificultad para acceder al centro activo.

#### 3.1.2.4. Estudio de la interacción lipasa- $^3\text{H}$ pal-CoA y seguimiento por fluorografía

Para demostrar que la activación encontrada en las lipasas fúngicas se debe a una interacción directa entre el pal-CoA y la lipasa se realizó un experimento con pal-CoA marcado radiactivamente con  $^3\text{H}$ . Con este fin, las

lipasas de *G.candidum* y *R.delemar* se incubaron durante 30 minutos con  $^3\text{Hpal-CoA}$ , sintetizado como se describe en materiales y métodos, a una concentración de  $2.8 \mu\text{M}$ . Posteriormente las muestras se analizaron por electroforesis para poder seguir y detectar la interacción a través de la marca radiactiva del  $^3\text{Hpal-CoA}$ .

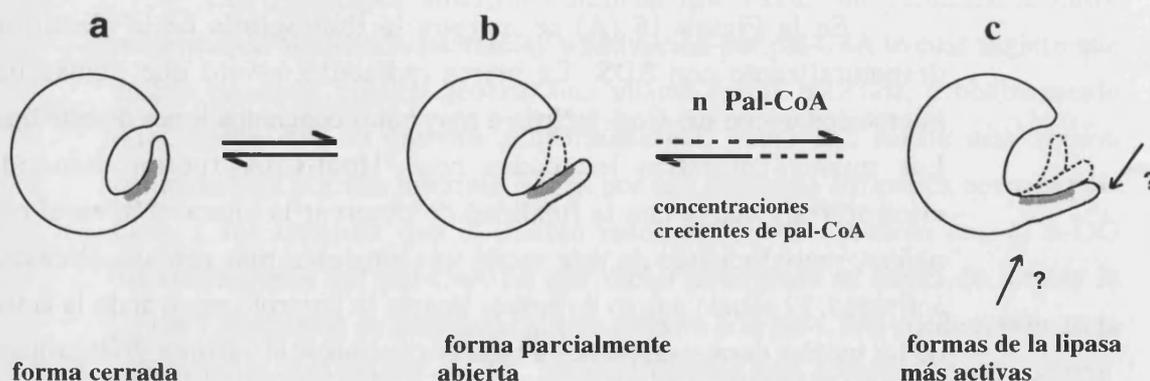


**Figura 16. Interacción del  $^3\text{Hpalmitoil-CoA}$  con las lipasas de *R.delemar* y *G.candidum*.** Fluorografía de las muestras de las lipasas incubadas con  $^3\text{HpalCoA}$   $2.8 \mu\text{M}$  durante 30 minutos sometidas a electroforesis (A) en SDS y (B) nativa. La concentración de lipasa fue 50 mg y 30 mg de extracto crudo/ml para GcL y RdL respectivamente.

En la Figura 16 (A) se muestra la fluorografía de la electroforesis desnaturante con SDS. La marca radiactiva reveló que ambas lipasas interaccionan con pal-CoA incluso a muy bajas concentraciones de este ligando. Las mismas muestras incubadas con  $^3\text{Hpal-CoA}$  fueron sometidas a electroforesis nativa con la finalidad de observar la interacción en el enzima nativo, reproduciendo de este modo una situación más cercana al ensayo de actividad. El estado nativo de ambas lipasas se controló ensayando la actividad de las bandas correspondientes a cada enzima hacia el sustrato PNP-propionato. La Figura 16 (B) muestra la fluorografía, de la electroforesis nativa revelada después de 30 días. Igual que en el caso anterior la marca radiactiva indicó una interacción del pal-CoA con ambos enzimas. Cabe señalar que en este caso, al ser una electroforesis nativa, las lipasas migran diferente puesto que su movilidad electroforética depende no sólo del peso molecular sino también de la carga.

Ambos resultados confirmaron la interacción directa entre ambas moléculas (desde muy bajas concentraciones), apoyando la hipótesis de que el efecto es independiente de la presencia de micelas de pal-CoA.

A partir de los resultados obtenidos con los acilderivados del coenzima A, se puede concluir que las lipasas fúngicas establecen una interacción monómero acil-CoA-lipasa. Dicha interacción se establece desde bajas concentraciones de derivado siendo probablemente de naturaleza hidrofóbica, a través de la cadena hidrocarbonada del acil-CoA. La activación inducida por esta familia de moléculas puede justificarse en base a la hipótesis y el modelo descritos para la interacción con el detergente n-OG. En el Esquema 4 se muestra el mismo modelo descrito para la activación de lipasas fúngicas por n-OG, adaptado al pal-CoA. Asumiendo el modelo de pre-equilibrio de conformeros (forma cerrada y menos cerrada) en ausencia de interfases, los acil-CoA activadores interaccionarían con las formas menos cerradas de dicho pre-equilibrio. Concentraciones crecientes de pal-CoA podrían generar más moléculas de lipasa activadas y el desplazamiento del equilibrio hacia formas más abiertas provocando un incremento general en la actividad. En cuanto a la forma de interacción, carecemos de pruebas físicas, pero los resultados obtenidos junto con datos de la literatura nos permiten hacer alguna sugerencia.



**Esquema 4. Esquema del modelo de interacción de lipasas fúngicas con palmitoil-CoA.** Adaptación del modelo de interacción de las lipasas fúngicas con n-OG. En el equilibrio pre-existente (**a**, forma cerrada y **b**, forma parcialmente abierta) el palCoA se uniría a la forma parcialmente abierta desplazando el equilibrio hacia formas conformacionales más abiertas **c**, (catalíticamente más competentes). La interacción con la lipasa se produciría en un punto no cercano al centro activo. Las flechas indican puntos hipotéticos en los que podría producirse dicha interacción.

Estableciendo una analogía con los resultados obtenidos con el n-OG la ausencia de inhibición indica que la interacción no se produce en el centro activo. Este hecho puede atribuirse al tamaño de la cabeza polar del acilderivado que impediría el acceso al centro activo. El estudio cristalográfico de Hermoso y colaboradores, en el que se describe la activación de la lipasa de páncreas mediante la interacción de una micela con el enzima, en un punto no demasiado cercano al centro catalítico (Hermoso *et al.*, 1997), sugiere que interacciones en puntos no tan cercanos al centro activo pueden dar lugar a cambios conformacionales que generan formas más activas.

### **3.2. Estudio de la aplicabilidad de la estrategia de TPI a reacciones de interés biotecnológico en medios no convencionales**

En esta segunda parte del trabajo se ha utilizado la estrategia de TPI como método de activación de lipasas para explorar su aplicabilidad y utilidad en reacciones de interés comercial y biotecnológico. Para ello se han seleccionado reacciones específicas y varias lipasas de diferentes orígenes que típicamente se usan en biotransformaciones. Como se ha visto en la primera parte del trabajo, las lipasas sometidas al tratamiento con la estrategia de TPI, exhiben mayor capacidad catalítica en comparación con las lipasas no tratadas. En esta parte, la lipasa activada ha sido obtenida liofilizándola desde un tampón acuoso en presencia de interfases, para obtener la máxima activación posible y posteriormente después de haber sido lavada y secada, se ha ensayado la actividad en diferentes condiciones.

#### **3.2.1. Aplicación de la estrategia TPI en reacciones para la obtención de ésteres de fragancias**

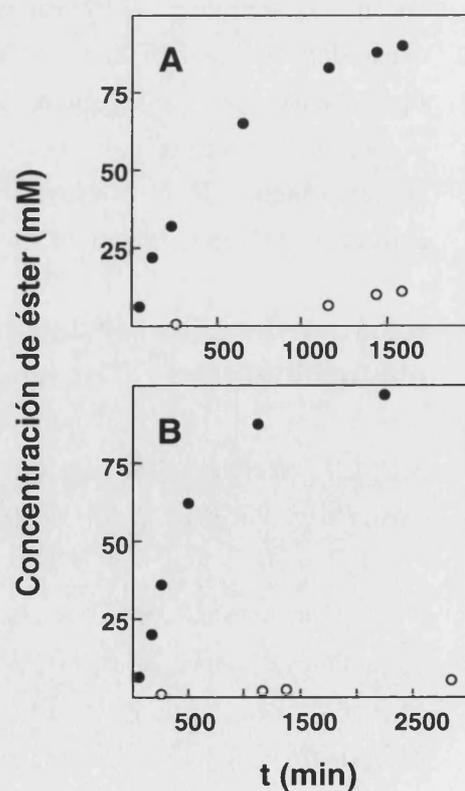
##### *3.2.1.1. Estudio de la actividad lipasa y rendimientos en la esterificación directa de alcoholes terpénicos*

Las lipasas han sido extensamente utilizadas y han suscitado gran interés en la síntesis comercial de ésteres de aromas y fragancias (Karrachaabouini, *et al.*, 1996; Yee *et al.*, 1995; Talon *et al.*, 1996). Este elevado interés y el alto nivel de investigación en este área, se debe principalmente a que la obtención de

estos ésteres a partir de fuentes naturales requiere mucho tiempo, resultan económicamente inasequibles, y en ocasiones, existe restricción en el suministro de material natural. Por otro lado, su síntesis química produce bajos rendimientos y es por este motivo por lo que se han desarrollado diferentes estrategias para aumentar los rendimientos utilizando lipasas.

Debido a las dificultades que presentan este tipo de transformaciones se decidió explorar la utilidad de la estrategia de TPI en este área, para lo cual se investigó la producción de ésteres de fragancias con lipasas activadas mediante la estrategia. Las lipasas fueron tratadas siguiendo el protocolo de activación descrito en Materiales y Métodos, liofilizándolas desde un tampón con 40 mM de n-OG, excepto en el caso de la lipasa de *G.candidum*, la cual fue liofilizada desde 6 mM de AOT, por ser la interfase que mejores resultados dió en un estudio preliminar.

En la Figura 17 se muestran, a modo de ejemplo, las cinéticas de esterificación entre el geraniol y el ácido oleico, para las lipasas de ppL (A) y de CrL (B). La comparación de la evolución de la reacción llevada a cabo por las lipasas, activada por TPI y no activada, nos muestra un aumento claro en la velocidad de reacción de la primera con respecto a la control (no activada), en el intervalo de tiempo estudiado, indicando que la estrategia de activación por interfases funcionó para este tipo de reacciones.



**Figura 17.** Curso de la reacción de esterificación entre geraniol y ácido oleico. Lipasa activada (círculos rellenos) y no activada (círculos vacíos) para las lipasas ppL (A) y CrL (B). La concentración de los sustratos fue 100 mM de cada uno en n-hexano anhidro, y la concentración de las lipasas fue 10 mg/ml.

Una vez comprobada la utilidad de la estrategia, se hizo un estudio más amplio con otras lipasas y otras reacciones de interés. En la Tabla I se resumen las velocidades iniciales y los factores de activación (A.F.) correspondientes a la esterificación de tres alcoholes terpénicos diferentes por ácido oleico, utilizando cinco lipasas diferentes. Como puede observarse, todas las lipasas llevaron a cabo la esterificación con los tres alcoholes terpénicos aunque en diferente grado, siendo la más efectiva la lipasa de *R.delemar*. Además, en todos los casos la estrategia originó lipasas activadas con mayores velocidades iniciales que sus respectivos controles (lipasas no activadas), siendo estas diferentes en función del alcohol esterificado y de la lipasa. Los factores de activación muestran, claramente, la mejora obtenida con la estrategia observándose el valor mas alto para la lipasa de *R.miehei* en la esterificación del alcohol D,L-citronelol. En el caso de la esterificación del geraniol la lipasa de *G.candidum* fue la más efectiva y en la del geranilgeraniol la de páncreas porcino.

**Tabla I.** Velocidades iniciales de las lipasas activada y no activada (control), en la reacción de esterificación entre el ácido oleico y tres alcoholes terpénicos<sup>a</sup>.

Lipasa	Velocidad inicial ( $\mu\text{M}/\text{min}.\text{mg}$ lipasa)								
	Geraniol			D,L-Citronelol			Geranilgeraniol		
	Control	Activado	A.F.	Control	Activado	A.F.	Control	Activado	A.F.
<b>ppL</b>	0.33	9.0	27.3	0.27	9.2	34.0	0.09	4.2	46.7
<b>CrL</b>	0.06	0.93	15.5	0.1	1.46	14.6	0.03	0.59	19.7
<b>GcL</b>	0.06	3.7	61.7	0.3	1.5	5.0	0.1	0.9	9.0
<b>RdL</b>	52.0	70.0	1.3	3.8	140	36.8	12.0	40.0	3.3
<b>RmL</b>	0.15	2.3	15.3	0.06	5.3	88.0	0.1	0.56	5.6

<sup>a</sup> En todos los casos la concentración de cada sustrato fue 100 mM en n-hexano anhidro y las concentraciones de las lipasas fueron: 10 mg/ml para ppL y CrL, 5 mg/ml para RdL y 20 mg/ml para GcL. En el caso de RmL, se utilizó 180  $\mu\text{l}$  de la muestra dializada/ml de mezcla de reacción.

Como ya hemos señalado los aumentos en la velocidad inicial dependieron de la lipasa utilizada. Esto puede ser debido a que la estrategia, basada en un cambio conformacional, puede funcionar de forma diferente según el mecanismo de activación de cada enzima. Así se ha descrito para algunas lipasas de origen bacteriano o fúngico cierta flexibilidad en la solapa o más

facilidad para permanecer en su conformación abierta (Verger, 1997; Derewenda *et al.*, 1994b). Esto hace que la estrategia sea menos efectiva en estos casos, puesto que las muestras activadas se comparan con una lipasa que no está totalmente inactiva o cerrada.

En la Tabla II se muestran los rendimientos obtenidos (expresados como producción de éster, mM) a dos tiempos de reacción diferentes para las lipasas de CrL y ppL, en la esterificación del ácido oleico con los tres alcoholes terpénicos. Como puede observarse la estrategia permite la obtención de mejores rendimientos en todos los casos, siendo remarcable la esterificación de geraniol y citronelol con la lipasa de *C.rugosa*, en la cual se alcanza un valor próximo a 40 mM de producto en tan sólo 4 h de reacción mientras que para la lipasa no activada sólo se alcanza 0.4 mM de producto. Con las muestras activadas de ambas lipasas, también se observa que después de 24 h de reacción se llega casi al 100% de producto en la reacción de esterificación de los mismos alcoholes (geraniol y citronelol). Estos resultados demuestran que la estrategia permite la obtención de muy buenos rendimientos consiguiendo, en algunos casos, llegar al 100% de conversión de sustratos en productos en tiempos cortos de reacción.

**Tabla II.** Producción de éster obtenida con las lipasas activada y control (ppL y CrL) en la reacción de esterificación entre el ácido oleico y tres alcoholes terpénicos<sup>a</sup>.

Alcohol (lipasa)	Producción de Ester (mM)			
	4 h		24 h	
	Control	Activada	Control	Activada
Geraniol (ppL)	0.3	7.7	38.5	98.0
D,L-Citronelol (ppL)	3.0	18.0	38.0	78.0
Geranilgeraniol (ppL)	n.d. <sup>b</sup>	1.2	5.3	16.0
Geraniol (CrL)	0.4	36.2	2.4	98.0
D,L-Citronelol (CrL)	0.6	30.5	3.3	85.0
Geranilgeraniol (CrL)	n.d. <sup>b</sup>	3.0	0.5	16.0

<sup>a</sup> las condiciones experimentales fueron las mismas que se indican en la Tabla I.

<sup>b</sup> n.d.: no detectado en el tiempo indicado.

Dentro del marco de la esterificación de alcoholes que originan, al ser esterificados, fragancias y esencias se hizo un estudio con el alcohol secundario

**Tabla III.** Comparación entre las lipasas activada y control (CrL y GcL) en la reacción de esterificación entre el ácido oleico y el (-)-mentol<sup>a</sup>.

Lipasa	A.F.	Velocidad inicial ( $\mu\text{M}/\text{min.l}$ )		Producción de Ester (mM)			
		Control	Activada	4 h		24 h	
				Control	Activada	Control	Activada
CrL	50.7	0.7	35.0	n.d. <sup>b</sup>	8.4	1.0	60.8
GcL	11.1	0.8	7.8	0.5	3.3	1.1	11.2

<sup>a</sup> las condiciones experimentales fueron las mismas que se indican en la Tabla I.

<sup>b</sup> n.d.: no detectado en el tiempo indicado.

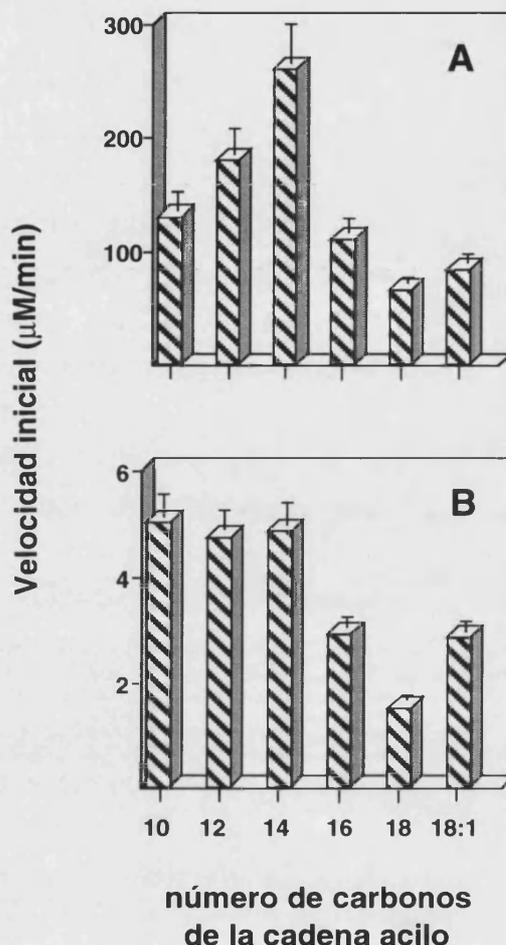
(-)-mentol. La utilización de este alcohol, nos permitió observar el resultado de la aplicación de la estrategia de TPI a la esterificación de un alcohol secundario y comparar los resultados obtenidos con las lipasas activada y no activada. De las lipasas ensayadas, sólo las lipasas de GcL y CrL fueron capaces de llevar a cabo la esterificación de dicho alcohol. En la Tabla III se muestran las velocidades iniciales, los factores de activación y los rendimientos (expresados como producción de éster, mM) a dos tiempos diferentes de reacción. Aunque las lipasas no activadas fueron capaces de llevar a cabo la reacción dieron rendimientos realmente bajos, mientras que la utilización de la estrategia permitió la obtención de muy buenos rendimientos, hasta del 60% en el caso de la lipasa de CrL. Es oportuno mencionar, que se ha descrito que la lipasa de *C.rugosa* posee una cavidad muy cerca del centro activo que le permitiría la orientación correcta de alcoholes secundarios para una eficiente catálisis, siendo esta la causa de la capacidad de catalizar el (-)-mentol (Rubin, 1994). En este caso la estrategia de TPI, también podría facilitar la accesibilidad a la cavidad que acomoda el alcohol secundario, al estar próximo al centro activo, y debido a lo cual la lipasa activada cataliza con más eficiencia este sustrato. Sin embargo, sólo las lipasas de *G.candidum* y *C.rugosa* pueden utilizar este alcohol como sustrato lo cual puede estar relacionado con el hecho de que ambas lipasas pertenecen a la misma familia, en base a la comparación de su secuencia aminoacídica, la cual revela que están relacionadas filogenéticamente y que por lo tanto comparten muchas características estructurales (Schrag et al., 1991; Lotti et al., 1994). El resto de enzimas ensayados (las lipasas de *R.miehei*, *R.delemar* y páncreas porcino), probablemente no orientan correctamente el alcohol para una eficiente catálisis, incluso ni siquiera para el enzima activado, lo cual indica que la estrategia, no dota de propiedades 'nuevas' al enzima, como por ejemplo

la adquisición de una determinada cavidad que le ayudase a una mejor orientación de un sustrato dado. Este resultado apoya la suposición de que la estrategia produce un desplazamiento en el equilibrio hacia formas abiertas (desplazando probablemente, la solapa) más que la generación de un centro catalítico 'diferente'.

### *3.2.1.2. Estudio de la influencia del ácido graso en la esterificación*

Para realizar este estudio se escogió como reacción modelo la esterificación del geraniol con ácidos grasos de diferente cadena, desde el ácido cáprico (C10) hasta el esteárico (C18), en tolueno anhidro y utilizando la lipasa de páncreas porcino. En la Figura 18 se muestran las velocidades iniciales para la lipasa activada y no activada en función del ácido graso utilizado en la esterificación. La figura muestra que la velocidad inicial de la lipasa fue dependiente de la longitud de la cadena del ácido graso utilizado, de manera similar a como se ha descrito para otras lipasas (Yee *et al.*, 1995; Talon *et al.*, 1996). La comparación de los resultados obtenidos con ambas lipasas (activada y no activada) indica que para todos los ácidos grasos la velocidad inicial fue mayor para la lipasa activada, con aumento de hasta 60 veces, con respecto a la lipasa control. Además, se observa que incluso en los ácidos grasos más desfavorables (ácido esteárico, C18 y oleico C18:1), la lipasa activada catalizó la esterificación unas 20 veces más eficientemente que en el caso de la esterificación del ácido graso más favorable (C10-C14), por la lipasa no activada. Por otra parte, el análisis de la figura, revela también cambios en la especificidad del ácido graso de la lipasa activada con respecto a la no activada. Así, para la lipasa no activada (B) la velocidad de reacción permanece constante para los ácidos grasos entre C10 y C14, seguido de un descenso de la actividad con el aumento de la longitud de la cadena del ácido graso, lo cual muestra una clara limitación estérica del centro catalítico. Para ácidos grasos de cadena corta la velocidad aumentó desde C2 hasta C10 (resultados no mostrados) posiblemente debido a una mayor afinidad como consecuencia de interacciones hidrofóbicas con la cadena acilo estabilizada en el centro catalítico de la lipasa. Para los ácidos grasos entre C10-C14 parece existir una compensación entre afinidad por la cadena hidrofóbica y tamaño del ácido graso, puesto que ácidos grasos de cadena más larga dan lugar a velocidades menores. Sin embargo en la lipasa activada (A) se observa un claro incremento en la actividad de la lipasa cuando se usa el ácido graso C14 frente al C10. En la lipasa activada no parece

**Figura 18. Esterificación del geraniol con ácidos grasos de diferente longitud de la cadena hidrocarbonada con la lipasa de páncreas porcino. Velocidad inicial para la lipasa activada (A) y no activada (B) en función del número de carbonos de la cadena acilo del ácido graso. La concentración de cada sustrato fue 100 mM en tolueno anhidro, y la concentración de lipasa utilizada fue 10 mg/ml.**



existir esa compensación entre afinidad y limitación estérica, aumentando la afinidad con la longitud de cadena hasta el ácido mirístico (C14). Este resultado indica claramente que el centro activo de la lipasa muestra menos impedimento estérico lo cual apoya la hipótesis de que la estrategia origina una lipasa que tiene el centro activo más accesible debido al desplazamiento de la solapa, originando una forma más activa. En este caso, la estrategia ha inducido un cambio en la especificidad de sustrato de la lipasa lo cual resulta muy interesante para reacciones de interés comercial con sustratos determinados cuya catálisis esté dificultada.

Entre los ácidos grasos utilizados se incluyó el ácido oleico para determinar la influencia de la insaturación. Como se observa en la figura, la utilización de este ácido graso produjo un aumento en la actividad tanto para la

lipasa activada como para la no activada, lo que se puede atribuir a una mejor acomodación del ácido graso en el centro activo.

### **3.2.2. La estrategia de TPI en reacciones en medio libre de disolvente.**

Es bastante conocido, que las biotransformaciones libres de disolvente mediadas por enzimas, más concretamente lipasas, tienen grandes ventajas desde el punto de vista comercial, como son por ejemplo, el uso de máximas concentraciones de sustratos así como la baja toxicidad de las conversiones y el ahorro económico, debido a la ausencia del disolvente como medio de reacción. Por estos motivos este tipo de reacciones han sido extensamente investigadas, para ser optimizadas, y aplicadas en diferentes áreas, como son la resolución de mezclas racémicas (Ergan *et al.*, 1995) y la síntesis de azúcares, grasas, fosfolípidos y glicéridos (Coulon *et al.*, 1995; Ergon, 1996; Han & Rhee, 1998).

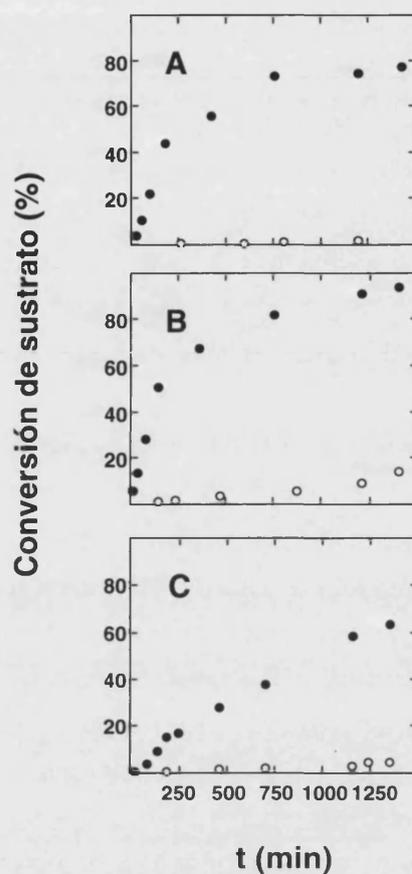
El interés que hay por las reacciones libres de disolvente planteó la posibilidad de aplicar la estrategia de TPI a reacciones que transcurren en estos medios, utilizando lipasas de diferentes orígenes y dos reacciones modelo, la esterificación directa y la transesterificación.

#### **3.2.2.1. Esterificación directa**

La Figura 19 muestra, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos para la lipasa activada y la no activada, en la reacción de esterificación directa entre ácido oleico y 1-hexanol, para la lipasa de CrL (A), PfL (B) y RnL (C). En los tres casos la estrategia dió lugar a lipasas que exhiben mayores velocidades de reacción en comparación con las lipasas control, no tratadas con la estrategia, en el intervalo de tiempo estudiado.

La Tabla IV, resume los datos obtenidos para la esterificación directa entre ácido oleico y 1-hexanol para nueve lipasas diferentes. También se muestran los factores de activación, así como los rendimientos a dos intervalos de tiempo diferentes para la lipasa activada y la no activada. En general, se observa que la estrategia originó lipasas con velocidades de reacción muy elevadas con respecto a las lipasas control (no activadas), como se refleja en los elevados factores de activación. También los rendimientos fueron mayores con las lipasas activadas comparado con las lipasas control. Tanto para la lipasa de *C.rugosa* como para la de *P.fluorescens* se obtuvieron rendimientos del 93.7%

**Figura 19.** Curso de la reacción de esterificación directa entre 1-hexanol y ácido oleico en medio libre de disolvente. Lipasa activada (círculos rellenos) y no activada (círculos vacíos) para las lipasas de (A) CrL, (B) Pfl y (C) RnL. La mezcla de reacción contenía 1.0 mmol de cada uno de los sustratos, y 25 (A), 20 (B) or 25 mg (C) de cada una de las lipasas utilizadas. La reacción se llevó a cabo a 25 ° C en viales cerrados.



**Tabla IV.** Comparación entre las lipasas control y activada en la esterificación entre ácido oleico y 1-hexanol en medio libre de disolvente<sup>a</sup>.

Lipasa	A.F.	Producción de Ester (%)					
		Velocidad inicial (nmoles/min.mg lipasa)		3 h		24 h	
		Control	Activada	Control	Activada	Control	Activada
ppL	50,4	0,45	22,7	< 0,5	7,5	1,5	20,1
CrL	105,0	0,47	49,3	< 0,3	42,5	1,2	78,2
RnL	38,7	0,89	34,4	0,3	15,8	4,1	63,3
RdL	109,0	12,8	1400	1,8	37,3	19,7	62,2
RjL	16,1	70,3	1125	9,1	40,6	49,1	63,8
AnL	6,7	0,35	2,4	< 0,2	1,0	1,4	9,9
PcL	3,0	3,3	9,8	0,6	1,9	9,3	27,4
HIL	5,3	0,32	1,7	n.d. <sup>b</sup>	0,4	0,9	5,0
PfL	47,0	3,7	174	1,3	50,2	13,8	93,7

<sup>a</sup> La mezcla de reacción contenía en todos los casos 1.0 mmoles de cada sustrato y la concentración de las lipasas fue la siguiente: 25 mg/ml para ppL, CrL, RnL y AnL; 20 mg/ml en el caso de PcL, HIL y PfL; 8 mg/ml para RdL y RjL.

<sup>b</sup> n.d.: no detectado en el tiempo de reacción indicado.

y un 78.2% respectivamente muy superiores a los obtenidos con la lipasa no activada. Por otro lado, es de destacar los resultados obtenidos con las lipasas activadas de *C.rugosa* (CrL), *R.delemar*(RdL), *R.javanicus* (*RjL*) y *P.fluorescens* (PfL), las cuales alcanzaron rendimientos de entre el 40-50% y cuyos controles (no activados) no superaron el 2% de conversión. En resumen, la Tabla muestra que la estrategia de TPI origina lipasas que llevan a cabo reacciones de esterificación con mejoras tanto en las velocidades iniciales como en los rendimientos de la reacción.

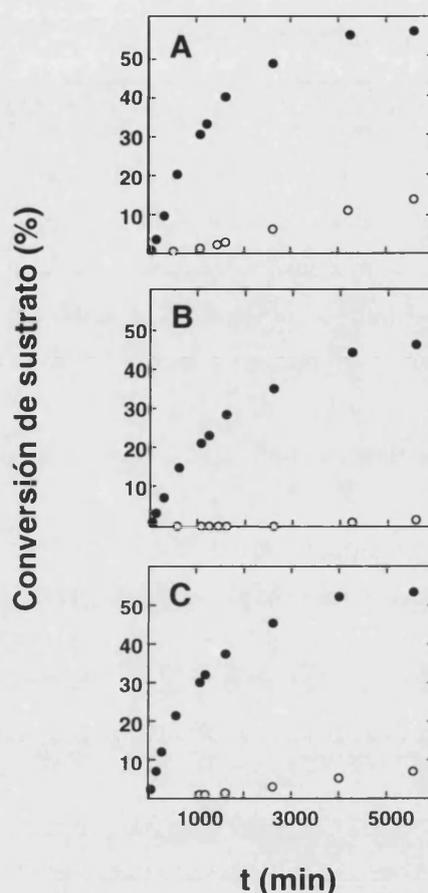
### 3.2.2.2. Transesterificación

Un estudio similar se llevó a cabo utilizando la estrategia de TPI en la reacción de transesterificación en medio sin disolvente escogiéndose como modelo la reacción entre 1-butil caprilato y 1-hexanol. La Figura 20, muestra el curso de la reacción para las muestras activadas y no activadas utilizando tres lipasas diferentes. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la estrategia de TPI funcionó, también en este caso con buenos resultados, observándose una conversión de sustrato a producto mayor con la lipasa activada.

En la Tabla V se resumen los resultados obtenidos para nueve lipasas de diferente procedencia utilizando la reacción de transesterificación. Se observa una mejora de los rendimientos y de las velocidades de reacción, siendo estos diferentes dependiendo de la lipasa utilizada. Cabe resaltar que en las lipasas de páncreas porcino, *R.niveus* y *R.javanicus*, se alcanzaron unos rendimientos de alrededor de un 40% en 24 horas de reacción, mientras que sus respectivos controles sólo alcanzaron un 2% de conversión en el mismo intervalo. También se observa que en general los rendimientos después de 48 horas fueron sólo ligeramente superiores a los obtenidos después de 24 horas de reacción. Las conclusiones derivadas de estos resultados son similares a las deducidas para la reacción de esterificación directa indicando que la estrategia de TPI también ofrece ventajas en las transesterificaciones en medio libre de disolvente.

Finalmente es oportuno mencionar algunas características favorables que puede ofrecer la estrategia de TPI en este tipo de conversiones. Las reacciones libres de disolvente se llevan a cabo en unas condiciones determinadas con objeto de aumentar las velocidades de reacción así como los rendimientos. Así se suele aumentar la velocidad enzimática y los rendimientos, por ejemplo mediante el aumento de temperatura (entre 40-80 °C), lo cual disminuye la viscosidad de sustratos. En ocasiones, se produce la inmovilización del

**Figura 20.** Curso de la reacción de transesterificación del éster 1-butil caprilato por 1-hexanol en medio libre de disolvente. Lipasa activada y no activada para las lipasas de (A) ppL, (B) CrL y (C) RnL. La mezcla de reacción contenía 1.2 mmol de cada uno de los sustratos y 30 mg de cada una de las lipasas utilizadas. La reacción se llevó a cabo a 25 °C en viales cerrados.



**Tabla V.** Comparación entre la lipasa control y activada, en la transesterificación entre 1-butil caprilato y 1-hexanol en medio libre de disolvente<sup>a</sup>.

Lipasa	A.F.	Producción de Ester (%)					
		Velocidad inicial (nmoles/min.mg lipasa)		24 h		48 h	
		Control	Activada	Control	Activada	Control	Activada
ppL	25,3	0,48	12,2	2,4	37,4	7,6	50,0
CrL	117,5	0,08	9,4	< 0,2	27,1	0,4	37,8
RnL	42,7	0,37	15,8	1,4	36,4	3,5	48,1
RdL	34,6	7,5	260,1	3,7	44,1	6,7	52,7
RjL	44,5	5,8	258,5	2,0	42,9	6,1	52,6
AnL	13,3	0,15	2,0	0,6	6,4	2,3	13,7
PcL	2,1	1,4	2,8	5,2	9,8	11,8	17,4
HIL	9,1	0,8	7,2	4,6	21,8	10,9	40,4
PfL	9	24,7	216,5	23,8	52,6	36,6	58,3

<sup>a</sup> La mezcla de reacción contenía en todos los casos 1.2 mmoles de cada sustrato y la concentración de las lipasas fue: 30 mg/ml para ppL, CrL, RnL, AnL, PcL y HIL; 10 mg/ml para PfL; 3 mg/ml para RdL y RjL.

catalizador en soportes de diferente naturaleza (resinas porosas, geles, perlas de vidrio), consiguiéndose una minimización de la difusión limitada de sustratos así como la posibilidad de reciclar el biocatalizador. Otras veces, se lleva a cabo la eliminación del agua producida durante la reacción, añadiendo en el medio perlas de tamiz molecular o bien utilizando reactores abiertos (Ergan, 1996). En la exploración de nuestra estrategia las condiciones que se han utilizado son bastante más sencillas y suaves: bajas temperaturas, 25 °C, lo que disminuye el coste energético y la hidrólisis de productos; no es necesaria la inmovilización, proceso a veces tedioso; no se realiza la eliminación del agua, permitiendo la utilización de reactores cerrados. Incluso en las condiciones suaves utilizadas en la estrategia de TPI, las cuales ofrecen algunas ventajas con respecto a las típicamente utilizadas, la estrategia ofrece muy buenos resultados en tiempos de reacción cortos, particularmente para aquellas lipasas tradicionalmente descartadas debido a la baja actividad que exhiben en estos medios.

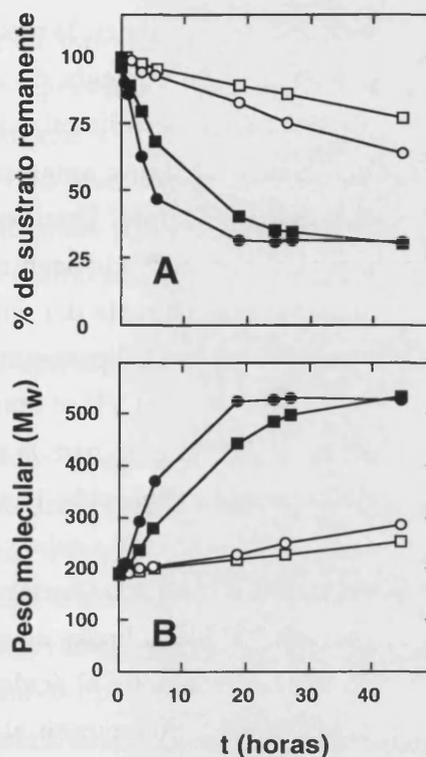
### 3.2.3. Reacciones de polimerización

Las reacciones de polimerización, típicamente llevadas a cabo en síntesis orgánica, es otra área interesante en la que investigar la aplicabilidad de la estrategia de TPI. Es bien conocido, que la utilización de lipasas es muy prometedora en la producción de ciertos poliésteres, no sólo porque permite llevar a cabo las conversiones en condiciones suaves sino también por la alta selectividad que muestran para la producción de poliésteres lineales (Binns *et al.*, 1993).

La Figura 21 muestra, a modo de ejemplo, el curso de la reacción de polimerización del ácido 10-hidroxidecanoico en alcohol terc-amílico, llevada a cabo por las lipasa de RjL y Pfl activada y no activada. En el panel A se muestra la desaparición de sustrato en función del tiempo y en el panel B el peso molecular medio del polímero sintetizado. Como puede observarse la estrategia produjo aumentos en la velocidad de reacción en ambas lipasas, acompañado por una mayor rapidez en la síntesis de polímeros de mayor peso molecular, de modo que en 40 h se alcanzó el polímero de peso molecular máximo con la lipasa activada.

La misma reacción fue utilizada para explorar las conversiones llevadas a cabo por otras lipasas. En la Tabla VI, se muestra los A.F. y la conversión después de 24 horas de reacción, para nueve lipasas diferentes. Entre ellas cabe destacar las de páncreas porcino, *R.javanicus* y *P.fluorescens* con las que se

**Figura 21.** Curso de la reacción de polimerización del ácido 10-hidroxicanoico. (A) Desaparición de sustrato y (B) peso molecular de los polímeros sintetizados, en función del tiempo de reacción, para las lipasas no activada (símbolos vacíos) y activada (símbolos rellenos) de RjL (cuadrados) y PfL (círculos). La concentración del sustrato en la mezcla de reacción fue 150 mM en alcohol terc-amílico siendo la concentración de lipasa en cada caso 20 mg/ml.



**Tabla VI.** Factores de activación y conversiones para la lipasa control y activada, obtenidos con lipasas de diferentes orígenes en la reacción de polimerización del ácido 10-hidroxicanoico en alcohol terc-amílico<sup>a</sup>.

Lipasa	A.F.	Conversion después de 24 horas de reacción (%)	
		Control	Activado
PpL	13,9	5,5	44,6
CrL	4,2	1,0	5,2
RnL	9,2	1,3	8,8
RjL	8,0	9,3	63,2
GcL	8,6	1,0	2,0
PfL	11,4	5,1	47,0
PcL	1,7	0,8	1,5
HIL	7,9	2,4	12,8
AnL	3,1	1,0	2,4

<sup>a</sup>En todos los casos la concentración de sustrato fue 150 mM y la concentración de cada lipasa en la mezcla de reacción fue 40 mg/ml.

obtuvieron los mejores resultados. En general, las diferencias entre la lipasa activada y no activada (control) fueron menores que en los casos anteriores. En este tipo de reacciones, la reacción se ve más limitada con el paso del tiempo ya que el sustrato aumenta de tamaño, como así lo indica el aumento del peso medio del polímero sintetizado. Como la lipasa activada realiza la reacción más rápidamente origina antes sustratos más grandes, viéndose limitada por el tamaño del sustrato. Este hecho hace que las diferencias entre el enzima no activado y el activado sean menores, aunque en cualquier caso se observa un aumento considerable del rendimiento de la reacción en tan sólo 24 horas, en comparación con la lipasa control.

En la Tabla VII se muestra la conversión a producto obtenida después de 24 horas de reacción para la polimerización del ácido adípico con el 1,4-dibencenodiol (Reacción 1) y del 16-hidroxipalmítico (Reacción 2), en alcohol terc-amílico, llevada a cabo con cuatro lipasas diferentes. En esta tabla hay que destacar los resultados correspondientes a las lipasas de *C.rugosa* y de páncreas porcino, ya que la lipasa no activada (control) no fue capaz de llevar a cabo la polimerización entre el ácido adípico y el 1,4-dibencenodiol, (Reacción 1) no detectándose producto en el intervalo de tiempo estudiado. Sin embargo, la estrategia permitió la polimerización de estos sustratos, al originar una lipasa más activa que es capaz de llevar a cabo la polimerización con más eficacia que la lipasa control, al poseer un centro catalítico menos ocluído.

**Tabla VII.** Conversiones obtenidas con las lipasas activada y no activada (control), para lipasas de diferentes orígenes, en las reacciones de polimerización indicadas.

Lipasa	Conversión después de 24 horas de reacción (%)			
	Reacción 1 <sup>b</sup>		Reacción 2 <sup>b</sup>	
	Control	Activado	Control	Activado
ppL	n.d. <sup>c</sup>	7,2	3,8	9,0
CrL	n.d. <sup>c</sup>	3,0	n.d. <sup>c</sup>	2,0
RdL	2,0	27,3	26,5	42,6
RjL	2,5	30	10,0	60,3

<sup>a</sup> La concentración de cada sustrato utilizada fue 150 mM en alcohol terc-amílico. Las concentraciones de lipasa utilizadas en la mezcla de reacción fueron: 25 mg/ml para las lipasas de ppL y CrL; 20 mg/ml para las lipasas de RdL y RjL.

<sup>b</sup> Reacción 1: polimerización entre el ácido adípico y el 1,4-bencenodiol. Reacción 2: polimerización del ácido 16-hidroxipalmítico.

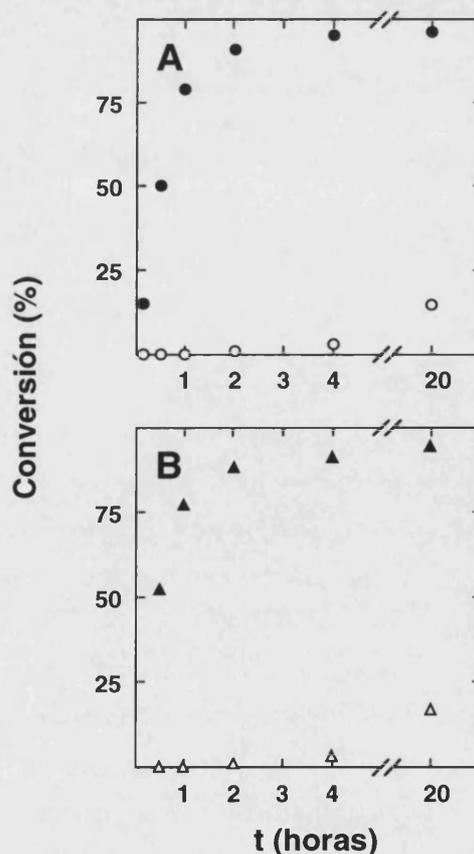
<sup>c</sup> n.d.: actividad no detectada para el tiempo de reacción indicado.

### 3.2.4. Acidolisis de triglicéridos

Como ya se mencionó en la introducción, la modificación de la estructura y composición de aceites y grasas por interesterificación tiene gran interés desde el punto de vista industrial y más, cuando se lleva a cabo con biocatalizadores, dentro de los cuales las lipasas tienen gran utilidad debido a su especificidad de posición y de ácido graso (Basheer *et al.*, 1995; Goto *et al.*, 1995). En todos los casos las lipasas fueron activadas con 40 mM de n-OG.

#### 3.2.4.1. Activación mediante la estrategia de TPI en la reacción de acidolisis de triglicéridos

Como primera aproximación en el estudio de triglicéridos se escogió como modelo la acidolisis de tripalmitina (TGC18) por ácido oleico en iso-octano anhidro. La Figura 22 muestra, a modo de ejemplo, la comparación del curso de la reacción modelo entre la lipasa activada y control, para las lipasas de RaL (A) y RdL (B). Como puede observarse, contrariamente a la lipasa control la cual mostró una baja actividad, ambas lipasas activadas completaron casi el 100% de la reacción en tan sólo 2 horas. Este resultado indica que la estrategia ofrece ventajas también en este tipo de reacciones de acidolisis con triglicéridos como sustrato.



**Figura 22.** Curso de la reacción de acidolisis de tripalmitina por ácido oleico. Lipasas de RaL (A) y RdL (B), no activada (símbolos vacíos) y activada (símbolos rellenos). La reacción se llevó a cabo en iso-octano anhidro a 40° C siendo la concentración de tripalmitina 10 mM y la de ácido 50 mM. Las concentraciones de las lipasas fueron 10 y 5 mg/ml para RaL y RdL respectivamente.

La Tabla VIII resume los valores de los factores de activación (A.F.) para diferentes lipasas en la reacción de acidolisis modelo. Del mismo modo que se ha visto para los otros casos anteriores, en general, se obtuvieron mayores velocidades de reacción con la lipasa activada que con la control (no activada) reflejado en la Tabla con factores de activación (A.F.) mayores de 1. Cabe señalar el A.F. <1 de la lipasa de *P.sp.* lo cual significa que la estrategia no funcionó en este caso, no observándose mayor actividad para la lipasa activada que para la no activada. Esto puede no ser tan sorprendente si se tiene en cuenta el hecho de que algunas lipasas microbianas tienen facilidad para mantener la forma activa de la lipasa en ausencia de interfases, y además hay otras que no 'exhiben activación interfacial' (Jaeger *et al.*, 1994; Schmid *et al.*, 1995).

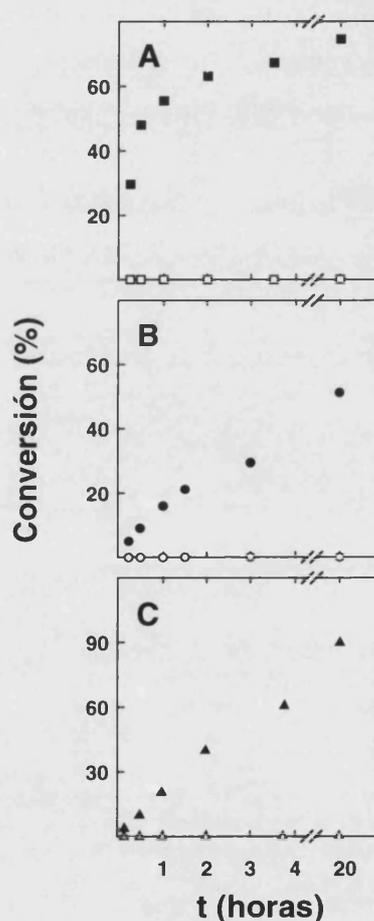
**Tabla VIII.** Factores de activación para lipasas de diferente origen en la reacción de acidolisis entre tripalmitina (10 mM) y ácido oleico (50 mM) en iso-octano anhidro a 40 °C.

Lipasa	A.F.
ppL	n.d. <sup>a</sup>
CrL	n.d.
RnL	n.d.
RaL	75 ± 8
RdL	60 ± 5
RjL	15 ± 3
AnL	5 ± 2
PfL	13 ± 4
PsL	0.9 ± 0.3

<sup>a</sup> n.d.: no se pudo calcular al no detectarse actividad en la lipasa no activada (control).

A diferencia del comportamiento observado para otras lipasas, con la lipasa de páncreas porcino, *C.rugosa* y *R.niveus* no se observó catálisis con la lipasa no activada incluso después de 20 horas de reacción (Figura 23). Esto viene reflejado por un 'n.d.' en el valor de A.F. de la Tabla VIII lo que indica que la velocidad de reacción para los controles fue cero puesto que no se detectó conversión. Sin embargo, cuando la lipasa fue sometida a la estrategia de TPI las tres lipasas resultaron ser muy activas con conversiones significativas incluso después de 2 horas de reacción en los tres casos (Figura 23). La estrategia convirtió una lipasa inactiva frente a la acidolisis de la tripalmitina en un enzima

muy activo frente a este mismo sustrato. Por los resultados obtenidos con otras reacciones más simples se sabe que esta inactividad frente a tripalmitina no es una propiedad intrínseca de la lipasa no activada, puesto que con otras reacciones, la lipasa control mostró actividad. Esto sugiere que la incapacidad de catalizar es dependiente del sustrato y puede deberse en parte a restricciones estéricas. Este resultado está de acuerdo con la hipótesis de que la lipasa no activada, presumiblemente cerrada, tiene un centro activo ocluido, por lo que hay dificultad para transformar un sustrato del tamaño de la tripalmitina, y que la estrategia de TPI genera una lipasa sin este tipo de restricciones debido a una apertura de la solapa.



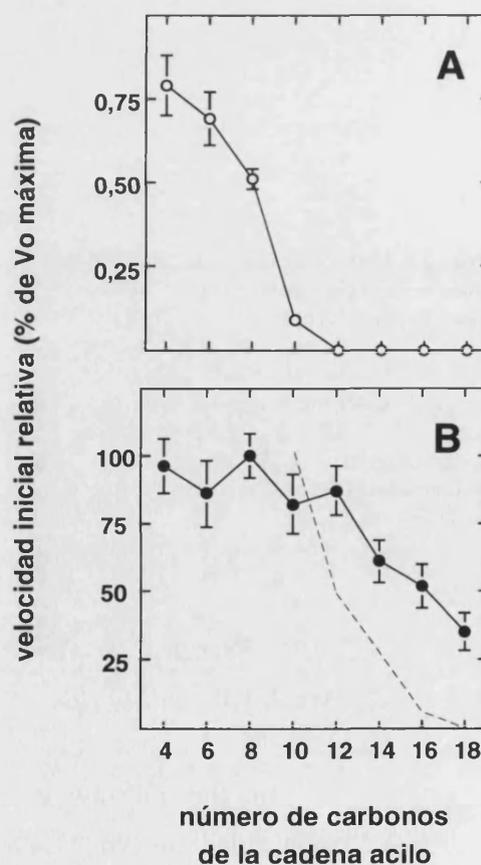
**Figura 23. Curso de la reacción de acidólisis de tripalmitina por ácido oleico.** Lipasas de ppL (A), CrL (B) y RnL (C), no activada (símbolos vacíos) y activada (símbolos rellenos). Las concentraciones de las lipasas fueron 25, 25 y 10 mg/ml, respectivamente. Las condiciones experimentales fueron las mismas que las de la Figura 22.

#### 3.2.4.2. Estudio de la selectividad de triglicérido de las lipasas activada y no activada

Para llevar a cabo un estudio comparativo entre la forma activada y la no activada de la lipasa en la capacidad de catalizar sustratos de tamaño creciente, se

realizó un experimento con triglicéridos de diferente longitud de cadena acilo. En la Figura 24 se muestra la actividad en función de la longitud de la cadena acilo del triglicérido para la lipasa de páncreas porcino, no activada (A) y activada (B) liofilizada en presencia de detergente (40 mM). En líneas discontinúas se muestra la velocidad inicial de la misma lipasa para la hidrólisis en tampón acuoso de los diferentes triglicéridos emulsificados con Triton X100. Los resultados indican que la lipasa no activada muestra una fuerte dependencia del triglicérido ensayado, siendo incapaz de catalizar triglicéridos de cadenas mayores de 12 átomos de carbono (TGC12). La actividad mostrada por la lipasa no activada indica que el TGC10 parece ser un sustrato crítico marcando la diferencia entre los sustratos pequeños y grandes, siendo muy baja su acidolisis. La lipasa activada, aunque mostró diferencias en la velocidad inicial según el triglicérido, fue capaz de actuar con toda la serie de triglicéridos ensayados. La accesibilidad al centro activo restringida a cierto tamaño de sustrato en la lipasa no activada, es superada cuando esta es liofilizada en presencia de 40 mM de detergente y se atrapa una conformación más abierta.

**Figura 24. Actividad de la lipasa de páncreas porcino en función de la longitud de la cadena del triglicérido.** Las lipasas no activada (A) y activada (B), fueron ensayadas en la acidolisis de los diferentes triglicéridos (10 mM) por ácido oleico (50 mM) en iso-octano anhidro a 40 ° C. Las velocidades iniciales están referidas a la máxima que se obtuvo en este tipo de reacción siendo de 15.2  $\mu\text{M}/\text{min}.\text{mg}$  de lipasa que corresponde a la velocidad inicial de la lipasa activada en la acidolisis de tricaprilina (TGC18). Las velocidades iniciales de la hidrólisis en medio acuoso de los diferentes triglicéridos han sido incluídas (línea punteada) utilizando como emulsificante Triton X-100 a una relación molar de sustrato:detergente 1:5.



En la Tabla IX se muestran los A.F. para los diferentes triglicéridos, para plasmar mejor la comparación entre la lipasa activada y no activada. En todos los casos se observa una activación considerable, con A.F. mayores de 100. Hay que señalar que para el TGC10 se observó un aumento de actividad para la lipasa activada de hasta tres órdenes de magnitud, 10 veces más que los aumentos observados para las conversiones con otros sustratos más sencillos. En los TGs mayores de TGC10, el A.F. no pudo calcularse por no detectarse actividad en la lipasa no activada. La estrategia permite utilizar sustratos que de otro modo no son transformados, produciendo por lo tanto un cambio en la especificidad del triglicérido. De nuevo se pone de manifiesto el interés de esta estrategia para la exploración de otras conversiones de la misma naturaleza.

**Tabla IX.** Factores de activación para la reacción de acidólisis de triglicéridos de diferente longitud de cadena (10 mM) con el ácido oleico (50 mM) en iso-octano anhidro a 40 °C, catalizada por la lipasa de páncreas porcino.

Triglicérido	A.F.
Tributirina (TGC4)	122 ± 10
Tricaproína (TGC6)	126 ± 13
Tricaprilina (TGC8)	197 ± 21
Tricaprina (TGC10)	920 ± 67
Trilaurina (TGC12)	n.d. <sup>a</sup>
Trimiristina (TGC14)	n.d.
Tripalmitina (TGC16)	n.d.
Triestearina (TGC18)	n.d.

<sup>a</sup>n.d.: no determinado. no se pudo determinar al no detectarse actividad en el control (no activado).

El estudio con triglicéridos presentado, permite una re-examinación del comportamiento de las lipasas en entornos no acuosos hacia sus sustratos naturales. Además ha sido propuesto previamente por otros autores (Míngarro et al., 1994; Holmquist *et al.*, 1995) que los estudios en medios no acuosos representan una forma interesante de investigar la actividad intrínseca de las lipasas hacia sus sustratos monoméricamente dispersados. La generación de una

forma activada mediante la estrategia de TPI, presumiblemente conformacionalmente más abierta, permite hacer un estudio comparativo de la lipasa en sus dos estados conformacionales, activado y no activado, hacia su sustrato natural insoluble en medio acuoso. Además se puede estudiar la actividad intrínseca del enzima eliminando otros factores que influyen en la actividad como son las propiedades físicas y la adsorción del enzima a la interfase. Así, la catálisis de la lipasa activada indica que la incapacidad de catalizar triglicéridos grandes (mayores de C10) no es una propiedad intrínseca de la lipasa sino sólo de su estado inactivo (Figura 24). Por otro lado, la actividad que muestra la lipasa activada con el TGC18, que en disolución acuosa fue nula (Figura 24, líneas punteadas) indica claramente que la lipasa de páncreas porcino posee la capacidad de transformar el sustrato pero sin embargo, en disolución acuosa no funciona probablemente debido a una adsorción o inactivación sobre la interfase. Por estos motivos, la estrategia se propone como una técnica para ensayar la actividad 'real' de la lipasa hacia sustratos solubles.

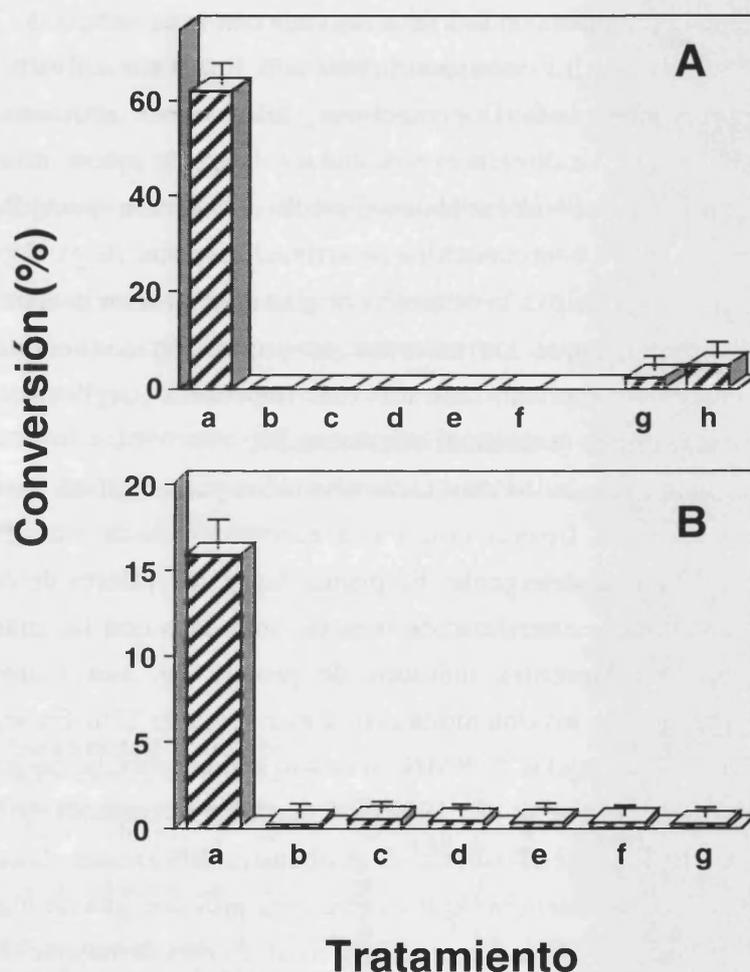
### **3.2.5. Consecuencias generales de la estrategia de TPI**

#### *3.2.5.1. Comparación de la estrategia con otros métodos de aumento de la actividad catalítica en medios no acuosos*

Como se ha señalado ya en la introducción las lipasas muestran baja actividad en disolventes orgánicos debido en parte a la agresión del disolvente y al cambio que experimentan en su estructura durante la liofilización. Para evitar estos efectos, se han utilizado varios métodos de protección del enzima para aumentar su actividad (resumidos en Braco & Mingarro,1996). De hecho, la elevada actividad obtenida con la lipasa tratada con la estrategia de TPI, podría estar relacionada con una mera protección de la lipasa por el anfífilo durante la liofilización o incluso en el disolvente.

Para reforzar nuestra hipótesis y descartar la protección como principal mecanismo causante de la activación se realizó un experimento en el que la lipasa fue sometida a diferentes tratamientos convencionales de protección de proteínas.

La Figura 25 muestra a modo de ejemplo, los resultados obtenidos con la lipasa activada y lipasa tratada con diferentes métodos de protección enzimática para dos tipos de reacción y dos lipasas diferentes. El panel A de la



**Figura 25. Conversión a producto obtenida mediante la estrategia de TPI y otras estrategias de mejora de la actividad enzimática en medios no convencionales.** Las diferentes estrategias utilizadas fueron: (a) estrategia de TPI con 40 mM n-OG; (b) lipasa control (no activada) no tratada con ningún método; adición al tampón de liofilización de (c) 2 % lactosa, (d) 2 % sorbitol en A y 2% de sacarosa en B, (e) 5 mg/ml KCl; (f) 25 mg/ml KCl; (g) 10 mM TX-100 (previamente descrito como un activador poco eficiente de la lipasa de ppL) en A y en B la lipasa fue utilizada sin ser liofilizada previamente; (h) inmovilización, por adsorción, del enzima en perlas de CPG. (A) Conversión al cabo de 2 h de reacción de acidólisis de tripalmitina (10 mM) por ácido oleico (50 mM) en iso-octano anhidro con lipasa ppL. (B) Conversión al cabo de 3 h en la reacción de esterificación entre 1-hexanol y el ácido oleico (1.0 mmol, 1:1), en medio libre de disolvente mediada por la lipasa de RnL.

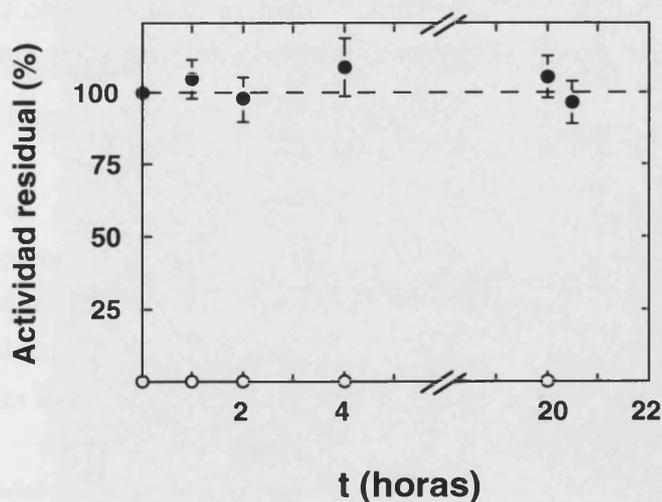
figura muestra para la lipasa de páncreas porcino, la transformación de triglicérido en la reacción de acidólisis de tripalmitina por ácido oleico, después de 2 horas de reacción. En el panel B se muestra la producción de 1-hexiloleato (por esterificación directa) después de 3 horas de reacción, en medio libre de disolvente utilizando la lipasa de *R.niveus*. En ambos casos se comparan los resultados obtenidos con la lipasa activada con la estrategia de TPI con 40 mM de n-OG (a) con los correspondientes a la lipasa no activada (b) y muestras protegidas utilizando lioprotectores, tales como azúcares (c,d) y sales inorgánicas (KCl a diferentes concentraciones, e,f), lipasa inmovilizada (panel A, h), directamente suspendida en el medio de reacción (panel B, g) o utilizando una interfase con baja capacidad de activación (panel A, g). Este resultado, nos indica que en principio, la estrategia origina aumentos en la actividad enzimática mucho mayores que los métodos de protección convencionales tanto en reacciones que implican sustratos más impedidos (triglicéridos A), como en reacciones simples (esterificación directa, B).

A la vista de los resultados obtenidos parece difícil explicar la elevada actividad de las lipasas como una consecuencia de un simple efecto de protección por el detergente. En primer lugar, los valores de conversión en la acidólisis y en la esterificación directa, obtenidos con las muestras de lipasa sometidas a diferentes métodos de protección, son muy pequeños en comparación con los obtenidos con la estrategia de TPI. En segundo lugar, se han descrito resultados de RMN en estado sólido sobre la integridad estructural de proteínas (Burke *et al.*, 1992) así como experimentos de intercambio de isótopo de hidrógeno (Desai & Klivanov, 1995) que demuestran que la liofilización en ausencia de lioprotectores produce una desnaturalización de alrededor de un 40% de los centros activos. Si esta demostración se extrapola a las lipasas no es fácil explicar los elevados factores de activación obtenidos con la estrategia de TPI, si sólo se supone un efecto de protección, incluso cuando se comparan con las muestras protegidas mediante métodos convencionales. En cualquier caso, no se descarta la posibilidad de que se produzca también una protección específica por el anfífilo localizado en el centro activo durante la liofilización. De este modo, la gran diferencia de actividad entre la forma activada y no activada es difícil de explicar si no se asume que la solapa de la lipasa de la forma activada se encuentra más abierta. Como conclusión, se puede decir, que dado el mecanismo de acción de las lipasas, no es sorprendente que los métodos convencionales de protección sean insuficientes para alcanzar la total activación que se obtiene mediante la estrategia de TPI.

### 3.2.5.2. Estabilidad de la lipasa en medios no acuosos. ¿Conformación de la lipasa abierta o cerrada en medios no acuosos?

Otra cuestión que pareció interesante investigar fue la estabilidad conformacional que muestran las lipasas en medios orgánicos después del tratamiento con la estrategia del TPI. Se realizó un experimento con la lipasa de páncreas porcino en el que la lipasa se trató según la estrategia, se liofilizó desde tampón en ausencia o en presencia de n-OG 40 mM y después se sometió a los lavados pertinentes. Las lipasas (activada y no activada) en polvo resultantes del tratamiento, se pre-incubaron. Después de diferentes intervalos de tiempo, se midió su actividad, escogiendo como reacción modelo la acidólisis de tripalmitina por ácido oleico en iso-octano. La Figura 26 muestra la actividad residual a diferentes tiempos de pre-incubación en iso-octano, observándose que ni en la lipasa activada ni en la control (no activada) hay variación de sus respectivas actividades.

**Figura 26. Estabilidad de la activación obtenida con la estrategia de TPI.** Actividad de las lipasa activada (círculos rellenos) y no activada (círculos vacíos) en función del tiempo de pre-incubación en iso-octano anhidro. El ensayo de la actividad residual se realizó utilizando la reacción de acidólisis de tripalmitina (10 mM) por ácido oleico (50 mM) en iso-octano anhidro a 40° C. La reacción modelo escogida fue la acidólisis de tripalmitina (10 mM) por ácido oleico (50mM) catalizada por la lipasa de páncreas porcino a una concentración de 20 mg/ml.



Con este resultado no sólo se obtiene evidencia de la estabilidad conformacional que poseen las lipasas activada y no activada, presumiblemente abierta y cerrada, sino que también se cuestiona la idea de que la lipasa en disolvente orgánico debe evolucionar hacia la forma abierta debido a estabilizaciones hidrofóbicas mantenidas entre el disolvente y la parte interna de la solapa (Martinelle & Hult, 1994; Holmquist *et al.*, 1995). Aunque en términos termodinámicos esta suposición sea razonable se contradice con la baja flexibilidad que poseen las proteínas en medios con bajo contenido en agua, prueba de lo cual es su alta termoresistencia (Affleck *et al.*, 1992; Burke *et al.*, 1993; Desai & Klibanov, 1995). Por este motivo, en términos cinéticos, es bastante improbable que una lipasa liofilizada desde tampón acuoso en su conformación cerrada sufra cambios conformacionales como la apertura de la solapa. De la Figura 26 se deduce que la lipasa no activada en disolvente orgánico muestra incapacidad de evolucionar hacia otras formas más activas y por lo tanto, conformacionalmente más abiertas. Esta hipótesis está apoyada por los resultados de Louwrier *et al.*, (1996) que muestran la incapacidad de lipasa de *R.miehei* de exhibir 'activación interfacial' en disolvente orgánico, al encontrarse en su conformación cerrada en el polvo de enzima, reflejo de la que tuvo en el tampón de liofilización. Del mismo modo la permanencia de la elevada actividad en la lipasa activada indica la incapacidad de evolucionar a otros estados conformacionales. Este resultado parece indicar que las formas abierta y cerrada de la lipasa están capturadas cinéticamente en el disolvente orgánico y no se puede producir ninguna evolución de la forma cerrada a la abierta o viceversa.

## 4. Conclusiones

A partir de los experimentos descritos en el presente trabajo se pueden deducir las siguientes conclusiones:

1. Por una parte, dentro del estudio de actividad con lipasas fúngicas:

a) Las lipasas fúngicas son inhibidas por el detergente n-OG a partir de concentraciones de 10 mM en tampón acuoso. Sin embargo, cuando se realiza un pre-tratamiento (pre-incubación), de las lipasas con el mismo detergente a altas concentraciones (30 mM) y posteriormente se diluyen para su ensayo en tampón acuoso los enzimas muestran elevadas actividades. Este hecho, denominado 'efecto de memoria', se atribuye a un cambio conformacional hacia una forma más activa (abierta) que es mantenida posteriormente durante el ensayo. Este estado activado es estable durante días debido, probablemente a la interacción con moléculas de detergente remanentes.

b) Los experimentos mediante la estrategia de atrapamiento de confórmers, utilizando sustratos de diferente tamaño, indican que concentraciones submicelares de n-OG inducen cambios conformacionales en las lipasas, originando confórmers más abiertos (más activados) cuanto mayor es la concentración del detergente, siendo bastante probable que la activación total se alcance a concentraciones micelares o incluso con estructuras superiores (emulsiones).

c) Los acilderivados de cadena larga (>10 Carbonos) producen activaciones directas en la lipasa, que podrían ser justificadas por la presencia de formas conformacionales más abiertas inducidas por una interacción lipasa-acil-CoA. Los resultados obtenidos con los diferentes derivados sugieren que la naturaleza de la interacción es hidrofóbica no implicando directamente al centro activo.

d) Se propone un modelo de activación de lipasas basado en la existencia de un pre-equilibrio previo de confórmers de lipasas (forma cerrada y forma abierta) en ausencia de anfífilo, de manera que las moléculas anfipáticas, a concentraciones submicelares, desplazarían el equilibrio hacia la forma abierta. Además de generar mayor número de formas abiertas, se inducirían formas conformacionalmente más abiertas que las anteriores (más activas), ya que con

mayores concentraciones de anfífilo o con cadenas acilo de mayor número de átomos de carbono se inducen enzimas catalíticamente más activos.

2. Por otro lado, dentro del marco de aplicaciones biotecnológicas:

a) La estrategia de TPI surge como una estrategia de mejora de enzimas lipolíticas en medios no convencionales, habiéndose comprobado su aplicabilidad en diferentes reacciones y medios con lipasas de diferente origen. Los incrementos de actividad en algunos casos llegan a ser de hasta 3 órdenes de magnitud. Se han puesto de manifiesto cambios de especificidad y de selectividad en el sustrato, abriéndose un área de exploración de reacciones con sustratos 'impedidos'. Se ha comprobado también que la forma activada (forma abierta) que se genera es totalmente estable en medio orgánico, y que contrariamente a lo sugerido por otros autores, la forma no activada (cerrada) se mantiene en el mismo estado en dicho medio.

b) Las rendimientos obtenidos con otros métodos convencionales de mejora de actividades de enzimas en medios no convencionales, son muy pequeños en comparación con los obtenidos con la estrategia de TPI, tanto en reacciones más simples como en reacciones con sustratos más impedidos. Las grandes diferencias observadas entre la lipasa activada y no activada (de hasta 1000 veces en algunos casos) son difíciles de explicar si no se supone la adquisición de una conformación abierta como consecuencia de la aplicación de la estrategia.

c) Además la estrategia TPI ofrece la posibilidad, de comparar las actividades enzimáticas de los dos formas conformacionales, la activa (abierta) y la poco activa (cerrada), de la lipasa, hecho que permite ensayar la capacidad catalítica 'real' del enzima independientemente de otras influencias como son las propiedades físicas de las interfases.

Finalmente la estrategia de TPI se presenta no sólo como una estrategia de mejora de enzimas lipolíticas en medios orgánicos, sino también como una herramienta muy útil en el estudio y mejor entendimiento de la relación estructura-actividad de biomoléculas ya que permite el atrapamiento de conformeros.

## 5. Bibliografía

Affleck, R., Xu, Z.-F., Zuzawa, V., Focht, K., Clark, D.S., Dordick, J.S. (1992). Enzymatic catalysis and dynamics in low-water environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1100-1104.

Almarsson, Ö., Klivanov, A.M. (1996). Remarkable activation of enzymes in nonaqueous media by denaturing organic cosolvents. *Biotechnol. Bioeng.*, **49**, 87-92.

Arnold, F.H. (1993). Protein engineering for unusual environments. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **4**, 450-455.

Bañó, M.C., Jackson, C.S., Magee, A.I. (1998). Pseudo-enzymatic S-acylation of a myristoylated Yes protein tyrosine kinase peptide *in vitro* may reflect non-enzymatic S-acylation *in vivo*. *Biochem. J.*, **330**, 723-731.

Basheer, S., Mogi, K., Nakagima, M. (1995). Surfactant-modified lipase for the catalysis of interesterification of triglycerides and fatty acids. *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 187-195.

Bell, G., Halling, P.J., Moore, B.D., Partridge, J., Rees, D.G. (1995). Biocatalyst behaviour in low-water systems. *Trends Biotechnol.*, **13**, 468-473.

Benedetti, F., Berti, F., Linda, P., Miertus, S., Sabot, A. (1996). Modeling of solvent effects in the activation of lipase from *Rhizomucor miehei*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 839-844.

Binns, F., Roberts, S.M., Taylor, A., Williams, C.F. (1993). Enzymic polymerisation of an unactivated diol/diacid system. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 899-904.

Bjorkling, F., Godfredsen, S.E., Kirk, O. (1991). The future impact of industrial lipases. *Trends Biotechnol.*, **9**, 360-363.

Blinkovsky, A.M., Martin, B.D., Dordick, J.S. (1992). Enzymology in monophasic organic media. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **3**, 124-129.

Braco, L. (1995). Biocatalysis and biorecognition in nonaqueous media. Some perspectives in analytical biochemistry. *Mikrochim. Acta*, **120**, 231-242.

Braco, L., Dabulis, K., Klivanov, A.M. (1990). Production of abiotic receptors by molecular imprinting of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 274-277.

Braco, L., Mingarro, I. (1996). Interfacial activation-based molecular bioimprinting: towards a more rational use of lipolytic enzymes in nonaqueous media. Engineering of/with lipases, in X. Malcata (Ed) Kluwer, Dordrecht, pp. 229-242.

Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Høge-Jensen, B., Nørskov, L., Thim, L., Menge, U. (1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*, **343**, 767-770.

Brockhoff, H. (1968). Substrate specificity of pancreatic lipase. *Biochim. Biophys. Acta.*, **159**, 296-303.

Brockman, H.L., Law, J.H., Keady, F.J. (1973). Catalysis by adsorbed enzymes. The hydrolysis of tripropionin by pancreatic lipase adsorbed to siliconized glass beads. *J. Biol. Chem.*, **248**, 965-970.

Brzozowski, A.M., Derewenda, U., Derewenda, Z.S., Dodson, G.G., Lawson, D.M., Turkenburg, J.P., Bjorkling, F., Høge-Jensen, B., Patkar, S.A., Thim, L. (1991). A model for interfacial activation in lipases from the structure of fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*, **351**, 491-494.

Burke, P.A., Griffin, R.G., Klivanov, A.M. (1992). Solid-state NMR assessment of enzyme active center structure under non-aqueous conditions. *J. Biol. Chem.*, **267**, 20057-20064.

Carrea, G., Ottolina, G., Riva, S. (1995). Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. *Trends Biotechnol.*, **13**, 63-70.

Carrière, F., Thirstrup, K., Boel, E., Verger, R., Thim, L. (1994). Structure-function relationships in naturally occurring mutants of pancreatic lipase. *Protein Eng., Prot.*, **7**, 563-569.

Clair, N.L.St., Navia, M.A. (1992). Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalyst. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 7314-7316.

Clark, D.S. (1994). Can immobilization be exploited to modify enzyme activity?. *Trends Biotechnol.*, **12**, 439-443.

Colton, I.J., Ahmed, S.N., Kazlauskas, R.J. (1995). A 2-propanol treatment increases the enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase toward esters of chiral carboxylic acids. *J. Org. Chem.*, **60**, 212-217.

Costantino, H.R., Griebenow, K., Langer, R., Klibanov, A.M. (1997). On the pH memory to lyophilized compounds containing protein functional groups. *Biotechnol. Bioeng.*, **53**, 345-348.

Dabulis, K., Klibanov, A.M. (1993a). Molecular imprinting of proteins and other macromolecules resulting in the new adsorbents. *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 176-185.

Dabulis, K., Klibanov, A.M. (1993b). Dramatic enhancement of enzymatic activity in organic solvents by lyoprotectants. *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 566-571.

Derewenda, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Dodson, G.G., Yamaguchi, S., Haas, M.J., Derewenda, Z.S. (1994a). An unusual buried polar cluster in a family of fungal lipases. *Nature Struct. Biol.*, **1**, 36-47.

Derewenda, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Yamaguchi, S., Joerger, R., Haas, M.J., Derewenda, Z.S. (1994b). Current progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi. *Protein Eng.*, **7**, 551-557.

Derewenda, U., Swenson, L., Wei, Y., Green, R., Kobos, M., Joerger, R., Haas, M.J., Derewenda, Z.S. (1994c). Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*. *J. Lipid. Res.*, **35**, 524-534.

Derewenda, Z.S. (1995). A twist in the tale of lipolytic enzymes. *Nature Struct. Biol.*, **2**, 347-349.

Desai, U.R., Klibanov, A.M. (1995). Assessing the structural integrity of a lyophilized protein in organic solvent. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 3940-3945.

Desnuelle, P., Sarda, L., Aihaud G. (1960). Inhibition de la lipase pancreatique par le p-nitrophenyl phosphate en emulsion. *Biochim. Biophys. Acta*, **37**, 570-571.

Dordick, J.S. (1991). Non-aqueous enzymology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2**, 401-417.

Egloff, M.-P., Marguet, M., Buono, G., Verger, R., Cambillau, C., van Tilbeurgh, H., (1995). The 2.46 Å resolution structure of the pancreatic lipase-colipase complex inhibited by a C11 alkyl phosphonate. *Biochemistry*, **34**, 2751-2762.

Embleton, J.K., Pouton, C.W. (1997). Structure and function of gastrointestinal lipases. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **25**, 15-32.

Faber, K.M., Franssen, C.R. (1993). Prospects for the increased application of biocatalysis in organic transformations *Trends Biotechnol.*, **11**, 461-470.

Fitzpatrick, P.A., Steinmetz, A.C.U., Ringe, D., Klivanov, A.M., (1993). Enzyme crystal structure in a neat organic solvent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8653-8657.

Gill, I., Valivety, R. (1997). Polyunsaturated fatty acids, part 2: biotransformations and biotechnological applications. *Trends Biotechnol.*, **15**, 470-478.

Goto, M., Goto, M., Kamiya, N., Nakashio, F. (1995). Enzymatic interesterification of triglyceride with surfactant-coated lipase in organic media. *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 27-32.

Griebenow, K., Klivanov, A.M. (1995). Lyophilisation-induced reversible changes in the secondary structure of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 10969-10976.

Griebenow, K., Klivanov, A.M. (1996). On protein denaturation in aqueous-organic mixtures but not in pure organic solvent. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 11695-11700.

Grochulski, P., Yunge, L., Schrag, J.D., Bouthillier, F., Smith, P., Harrison, D., Rubin, B., Cygler, M. (1993). Insights into interfacial activation from open structure of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.*, **268**, 12843-12847.

Han, J.J., Rhee, J.S. (1998). Effect of salt hydrate pairs for water activity on lipase-catalyzed synthesis of lysophospholipids in a solvent-free system. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **22**, 158-164

Hartsough, D.S., Merz, K.M.Jr. (1993). Protein dynamics and solvation in aqueous and nonaqueous environments. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 6529-6537.

Hermoso, J., Pignol, D., Kerfelec, B., Crenon, I., Chapus, C., Fontecilla-Camps, J.C. (1996). Lipase activation by nonionic detergent *J. Biol. Chem.*, **271**, 18007-18016.

Hermoso, J., Pignol, Penel, S., Roth, M., Chapus, C., D., Fontecilla-Camps, J.C. (1997). Neutron crystallographic evidence of lipase-colipase complex activation by a micelle. *EMBO J.*, **16**, 5531-5536.

Hjorth, A., Carrière, F., Cudrey, C., Woldike, H., Boel, E., Lawson, D.M., Ferrato, F., Cambillau, C., Dodson, G.G., Thim, L., Verger, R. (1993). A structural domain (the lid) found in pancreatic lipases is absent in the guinea pig (phospho)lipase. *Biochem.*, **32**, 4702-4707.

Holmquist, M., Clausen, I.G., Patkar, S., Svendsen, A., Hult, K. (1995). Probing a functional role of Glu87 and Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase through transesterification reactions in organic solvent. *J. Prot. Chem.*, **14**, 217-224.

Holmquist, M., Martinelle, M., Berglund, P., Clausen, I.G., Patkar, S., Svendsen, A., Hult, K. (1993). Lipases from *Rhizomucor miehei* and *Humicola lanuginosa*: modification of the lid covering the active site alters enantioselectivity. *J. Prot. Chem.*, **12**, 749-757.

Jaeger, J.-E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van heuvel, M., Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.*, **15**, 29-63.

Jaeger, K.-E., Schneidinger, B., Rosenau, F., Werner, M., Lang, D., Dijkstra, B.W., Schimossek, K., Zonta, A., Reetz, M.T. (1997). Bacterial lipases for biotechnological applications. *J. of Molec. Catal. B.: enzymatic*, **3**, 3-12.

Jennens, M.L., Lowe, M.E. (1994). A surface loop covering the active site of human pancreatic lipase influences interfacial activation and lipid binding. *J. Biol. Chem.*, **269**, 25470-25474.

Jennens, M.L., Lowe, M.E. (1995). Rat GP-3 is a pancreatic lipase with kinetic properties that differ from colipase-dependent pancreatic lipase. *J. Lipid Res.*, **36**, 2374-2382.

Joerger, R.D., Haas, M.J., (1994). Alteration of chain length selectivity of a *Rhizopus delemar* lipase through site-directed mutagenesis. *Lipids*, **29**, 377-384.

Johansson, A., Mosbach, K., Månsson, M.-O. (1995). Horse liver alcohol dehydrogenase can accept NADP<sup>+</sup> as coenzyme in high concentrations of acetonitrile. *Eur. J. Biochem.*, **227**, 551-555.

Karrachaabouni, M., Pulvin, S., Touvard, D., Thomas, D. (1996). Enzymatic synthesis of geraniol esters in a solvent-free system by lipases. *Biotechnol. Lett.*, **18**, 1083-1088.

Kazlauskas, R.J., (1994). Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: prospects for predicting and engineering catalytic properties. *Trends Biotechnol.*, **12**, 464-472.

Klibanov, A.M. (1986). Enzymes that work in organic solvents. *CHEMTECH*, **16**, 354-359.

Klibanov, A.M. (1989). Enzymatic catalysis in anhydrous solvents. *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 141-144.

Klibanov, A.M. (1995). What is remembered and why?. *Nature*, **374**, 596.

Klibanov, A.M. (1997). Why are enzymes less active in organic solvents than in water?. *Trends Biotechnol.*, **15**, 97-101.

Klibanov, A.M., Ahern, T.J. (1987). Thermal stability of proteins. *Protein Eng.*, 213-218.

Kim, K.K., Song, H.K., Shin, D.H., Hwang, K.Y., Suh, S.W. (1997). The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure*, **5**, 173-185.

Knmelnitsky, Y.L., Welch, S.H., Clark, D.S., Dordick, J.S. (1994). Salts dramatically enhance activity of enzymes in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 2647-2648.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Laitinen, H.A., Harris, W.E. (1975). En *Chemical Analysis*, 2nd Ed., McGraw-Hill, New York, pp. 361-363.

Lamare, S., Sánchez-Montero, J.M., Legoy, M.D. (1992). Modulation of lipolytic activity and stability using sugars. *Ann. NY Acad. Sci.*, **672**, 171-177.

Lang, D., Hofmann, B., Haalck, L., Hecht, H.-J., Spener, F., Schmid, R.D., Schomburg, D. (1996). Crystal structure of a bacterial lipase from *Chromobacterium viscosum* ATCC 6918 refined at 1.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **259**, 704-717.

Lawson, D.M., Brzozowski, A.M., Dodson, G.G. (1992). Lifting the lid of lipases. *Curr. Biol.*, **2**, 473-475.

Lawson, D.M., Brzozowski, A.M., Dodson, G.G., Hubbard, R.E., Høge-Jensen, B., Boel, E., and Derewenda, Z.S. (1994). The three-dimensional structures of two lipases from filamentous fungi. En: Woolley, P. and Petersen, S.B. (eds), *Lipases-Their Structure, Biochemistry and Application*. Cambridge University Press, UK, pp. 77-94.

Lotti, M., Tramontano, A., Longhi, S., Fusetti, F., Brocca, S., Pizzi, E., Alberghina, L. (1994). Variability within the *Candida rugosa* lipases family. *Protein Eng.*, **7**, 531-535.

Louwrier, A., Drtina, G.J., Klibanov, A.M., (1996). On the issue of interfacial activation of lipase in nonaqueous media. *Biotechnol. Bioeng.*, **50**, 1-5.

Lowe, M.E. (1997). Molecular mechanisms of rat and human pancreatic triglyceride lipases. *J. Nutr.*, **127**, 549-557.

Martinelle, M., Hult, K. (1994). Kinetics of triglyceride lipases. En: Woolley, P. and Petersen, S.B. (eds), *Lipases-Their Structure, Biochemistry and Application*. Cambridge University Press, UK, pp. 159-180.

Martinez, C., Nicolas, A., van Tilbeurgh, H., Egloff, M.-P., Cudrey, C., Verger, R., Cambillau, C. (1994). Cutinase, a lipolytic enzyme with a preformed oxyanion hole. *Biochem.*, **33**, 83-89.

Mattiasson, B., Adlercreutz, P. (1991). Tailoring the microenvironment of enzymes in water-poor system. *Trends Biotechnol.*, **9**, 394-398.

Mingarro, I., Abad, C., Braco, L. (1995). Interfacial activation-based molecular bioimprinting of lipolytic enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 3308-3312.

Mingarro, I., Abad, C., Braco, L. (1994). Characterization of acylating and deacylating activities of an extracellular phospholipase A<sub>2</sub> in a water-restricted environment. *Biochem.*, **33**, 4652-4660.

Muderhwa, J.M., Brockman, H.L. (1992). Lateral lipid distribution is a major regulator of lipase activity. *J. Biol. Chem.*, **267**, 24184-24142.

Mishra, P., Griebenow, K., Klibanov, A.M. (1996). Structural basis for the molecular memory of imprinted proteins in anhydrous media. *Biotechnol. Bioeng.*, **52**, 609-614.

Noble, M.E.M., Cleasby, A., Johnson, L.N., Egmond, M.R., Frenken, L.G.J. (1993). The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett.*, **331**, 123-128.

Okahata, Y., Toshiaki, M., (1997). Lipid-coated enzymes as efficient catalysts in organic media. *Trends Biotechnol.*, **15**, 50-54.

Ollis D.I., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J., Verschueren, K.H.G., Goldman, A. (1992). The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Protein Eng.*, **5**, 197-211.

Pantoliano, M.W. (1992). Proteins designed for challenging environments and catalysis in organic solvents. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2**, 559-568.

Parida, S., Dordick, J.S. (1991). Substrate structure and solvent hydrophobicity control lipase catalysis and enantioselectivity in organic media. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 2253-2259.

Peters, G.H., Toxvaerd, S., Larsen, N.B., Bjornholm, T., Schaumburg, K., Kjaer, K. (1995). Structure and dynamics of lipid monolayers: implications for enzyme catalysed lipolysis. *Nature Struct. Biol.*, **2**, 395-401.

Peters, G.H., Toxvaerd, S., Olsen O.H., Svendsen, A., (1997). Computational studies of the activation of lipases and the effect of hydrophobic environment. *Protein Eng.*, **10**, 137-147.

Rich, J.O., Dordick, J.S. (1997). Controlling subtilisin activity and selectivity in organic media by imprinting with nucleophilic substrates. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 3245-3252.

Rubin, B., (1994). Grease pit chemistry exposed. *Nature Struct. Biol.*, **1**, 568-572.

Russell, A.J., Klibanov, A.M. (1988). Inhibition-induced enzyme activation in organic solvent. *J. Biol. Chem.*, **263**, 11624-11626.

Sarda L., Desnuelle, P. (1958). Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion. *Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 513-521.

Sarney, D.B., Vulfson, E. (1995). Application of enzymes to the synthesis of surfactants. *Trends Biotechnol.*, **13**, 164-172.

Schrag, J.D., Cygler, M. (1993). 1.8 Å Refined structure of the lipase from *Geotrichum candidum*. *J. Mol. Biol.*, **230**, 575-591.

Schrag, J.D., Li, Y., Wu, S., Cygler, M. (1991). Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature*, **351**, 761-764.

Schrag, J.D., Li, Y., Wu, S., Cygler, M., Lang, D., Burgdorf, T., Hecht, H.-J., Schmid, R., Schomburg, D., Rydel, T.J., Oliver, J.D., Strickland, L.C., Dunaway, C.M., Larson, S.B., Day, J., McPherson, A. (1997). The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure*, **5**, 187-202.

Schmid, R.D., Menge, U., Schomburg, D., Spener, F. (1995). Towards novel biocatalysis via protein design: the case of lipases. *FEMS Microb. Rev.*, **16**, 253-257.

Smith, R.H., Powell, G.L. (1986). The critical micelle concentration of some physiologically important fatty acyl-coenzyme A's as a function of chain length. *Arch. Biochem. Biophys.*, **244**, 357-360.

Ståhl, M., Jeppsson-Wistrand, U., Månsson, M.-O., Mosbach, K. (1991). Induced stereoselectivity and substrate selectivity of bio-imprinted  $\alpha$ -chymotrypsin in anhydrous organic media. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 9366-9368.98

Sugihara, A., Gargouri, Y., Piéroni, G., Rivière, C., Sarda, L., Verger, R. (1986). Activities and interfacial properties of *Rhizopus delemar* and porcine pancreatic lipases after treatment with phospholipids. *Biochem.*, **25**, 3430-3434.

Talon, R., Montel, M.C., Berdague, J.L. (1996). Production of flavor esters by lipases of *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus xylosum*. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **19**, 620-622.

Thirstrup, K., Verger, R., Carrière, F. (1994). Evidence for a pancreatic lipase subfamily with new kinetic properties. *Biochem.*, **33**, 2748-2756.

Towler, D., Glaser, L. (1986). Protein fatty acid-acylation: enzymatic synthesis of an N-myristoyl glycyl peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2812-2816.

Uppenberg, J., Hansen, M.T., Patkar, S., Jones, T.A., (1994). The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*, **2**, 293-308.

van der Berg, B., Tessari, M., Boelens, R., Dijkman, R., de Haas, G.H., Kaptein, R., Verheij, H.M. (1995a). NMR structures of phospholipase A<sub>2</sub> reveal conformational changes during interfacial activation. *Nature Struct. Biol.*, **2**, 402-406.

van der Berg, B., Tessari, M., de Haas, G.H., Verheij, H.M., Boelens, R., Kaptein, R. (1995b). Solution structure of porcine pancreas phospholipase A<sub>2</sub>. *EMBO J.*, **14**, 4123-4131.

van Kuiken, B.A., Behnke, W.D. (1994). The activation of porcine pancreatic lipase by *cis*-unsaturated fatty acids. *B.B.A.*, **1214**, 148-160.

van Tilbeurgh, H., Egloff, M.P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R., Cambillau, C. (1993). Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature*, **362**, 814-820.

Verger, R. (1997). 'Interfacial activation': facts and artifacts. *Trends Biotechnol.*, **15**, 32-38.

Verheij, H.M., Slotboom, A.J., de Haas, G.H. (1981). Structure and function of phospholipase A<sub>2</sub>. *Rev. Physiol., Biochem. Pharm.*, **91**, 91-137.

Vulfson, E.F., (1994). Industrial applications of lipases. En: Woolley, P. and Petersen, S.B. (eds), *Lipases-Their Structure, Biochemistry and Application*. Cambridge University Press, UK, pp. 271-288.

Wescott, C.R., Klibanov, A.M. (1994). The solvent dependence of enzyme specificity. *Biochim. Biophys. Acta*, **1206**, 1-9

Winkler, F.K., D'Arcy, A., Hunziker, W. (1990). Structure of human pancreatic lipase. *Nature*, **343**, 771-774.

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,  
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de

Dña Herminda Gontiel Navarro

la calificación de APTO cum laude por UNANIMIDAD

Valencia, a 15 de junio de 1998

El Secretario,

El Presidente

