



Universitat Autònoma de Barcelona

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA

DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA

**RECUPERACIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DE LIPASAS PRODUCIDAS POR *Candida rugosa*.
APLICACIÓN A LA RESOLUCIÓN DE COMPUESTOS
QUIRALES Y DISEÑO DEL REACTOR ENZIMÁTICO.**

Programa de Doctorado:

BIOTECNOLOGÍA

Memoria que para optar al grado de Doctor en Ingeniería Química presenta:

ANTONIO SÁNCHEZ FERRER

FRANCISCO VALERO BARRANCO, Profesor titular del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona y

FCO. JAVIER LAFUENTE SANCHO, Profesor titular del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFICAN:

Que el licenciado Antonio Sánchez Ferrer ha realizado, bajo nuestra dirección, el trabajo que, con título "**Recuperación, purificación y caracterización de lipasas producidas por *Candida rugosa*. Aplicación a la resolución de compuestos quirales y diseño del reactor enzimático**", presenta en esta memoria, la cual constituye su Tesis para optar al Grado de Doctor en Ingeniería Química.

Y para que conste a los efectos que corresponda, presentamos a la Escola Técnica Superior d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona el trabajo citado, firmando el presente certificado en **Bellaterra**, a 1 de Setiembre de 1998.



Francisco Valero Barranco



Fco. Javier Lafuente Sancho

A mis padres

Agradecimientos

A lo largo de los 3 años y medio que me ha ocupado la realización de este trabajo, muchas han sido las personas que con su ayuda, atención, saber escuchar o simple compañía se han hecho merecedoras de aparecer en este apartado. Sin embargo, todas las tesis, como las personas, nunca son por definición completas o perfectas, como estoy seguro que no lo será la lista de gente incluida aquí en este momento.

En primer lugar, quería dedicar este trabajo a mis padres, las personas que han hecho que yo estudiara y que siempre han procurado, dentro de sus posibilidades, que yo tuviera lo mejor.

También quiero dedicar este trabajo a Laura, la que ha sido mi compañera durante todos estos años, recordándole la deuda que tengo con ella por todo el tiempo que este trabajo nos ha robado.

A mis amigos, Alex, Joan, Julián, **Javi**, Ramón, José Ramón y los que ahora no recuerdo, por formar parte de mi vida y haber compartido tantas cosas conmigo, convirtiéndose en una parte fundamental de mi vida.

Quiero agradecer a mis directores de tesis, Paco y Javier, además de formarme como científico, el haber sabido convertirse en mis amigos, tanto que se me haga difícil llamarles más "jefes" o "directores". A ellos, que siempre han estado a mi lado, querría recordarles que mi compromiso personal con ellos va más allá de estos 3 años y medio.

Quiero dejar constancia aquí también de la suerte que he tenido de trabajar en un grupo de investigación como el de lipasas. Los conocimientos tanto científicos como humanos que he obtenido del trabajo en este grupo no se pueden explicar en cuatro líneas, pero me gustaría citar aquí a Alberto Sanz, que ha compartido tantas y tantas cosas y horas conmigo, Pau Ferrer y José Luís Montesinos, que me han inculcado el rigor como norma de trabajo, y a Caries Casas, cuya experiencia y sentido común han sido uno de los pilares de mi formación.

Mención aparte querría hacer de Alicia, que para mí ha sido como un soplo de aire fresco en momentos críticos de mi trabajo. Su simpatía, compañía y ayuda quedarán siempre en mi memoria.

A Oriol, me **gustaría** desearle toda la suerte del mundo en su tesis.

Me gustaría hacer extensivo este agradecimiento a toda la gente del Departament d'**Enginyeria** Química, por crear el entorno de trabajo adecuado en el que ha sido posible desarrollar este trabajo.

En particular, me gustaría agradecer a todos aquellos que me han demostrado que ser Doctor es algo más que comparecer ante un tribunal durante unos minutos y redactar un manuscrito, entre ellos a Pau Ferrer, José Luís Montesinos, Montse **Sarrà**, Joan Albiol, José Luís del Río, Eugenio **Ferreira**, **Fela** Vázquez, Nuria Adroer, Caries **Campmajó** y sobretodo, Goyo Alvaro, cuya colaboración fue clave en ciertos momentos de esta tesis.

También me gustaría dar las gracias a aquella gente que me ha ayudado en un momento u otro en el laboratorio, en particular a Silvia Romero y Mercé Fité.

A Juan Baeza y David Gabriel, por compartir tantos conocimientos, experiencias y otras cosillas.

A la gente del grupo de Péptidos, por el interés que demostraron y por sus aportaciones a este trabajo, en especial, a Gloria Caminal.

A dos personas para mí muy especiales que compartieron conmigo algo más que sus horas de trabajo, Rosi **Tello** y Manuel Plaza, que además pueden sentirse coautores de este trabajo.

A la gente de la Escuela de Mollet, en particular Xavi y M^a Angels, por haber **confiado** en mí, y a los que espero corresponder en los próximos años.

A Caries Solà, por sus **clases**.

A Manel Poch, por haberse interesado siempre en mí y en mi trabajo.

A la gente de **Purac** Bioquímica, por los ocho meses que pasé allí aprendiendo a ver las cosas desde otro punto de vista.

A Nacho, por todos los momentos que hemos compartido "en las ondas" y a toda la gente anónima que he conocido **virtualmente**.

A la tropa que nos reunimos a comer en la **Mercé**, Joan, José Luís, Alberto, Fernando, Oriol, etc. por los ratos que hemos pasado juntos.

A las señoras de la limpieza de la UAB, por haber sido mi única compañía en muchas horas de la realización de este trabajo.

A la Generalitat de Catalunya, que me financió con una beca durante la realización del trabajo y a la Universitat Autònoma de Barcelona, que me permitió la realización de este trabajo.

A los programas **BIO-4-96-0005** (European Program on Biotechnology), **QFN94-4627-C02-1** (Programa de Química Fina, Plan Nacional de R+D. **CIRIT**, Generalitat de Catalunya) y **CICYT-QUI97-0506-C03** (Programa Español en Tecnologías de Procesos Químicos) que financiaron nuestro proyecto de investigación durante estos años.

A toda la gente que participó en dichos proyectos y con la que he tenido la suerte de trabajar, A Marisa Rúa y su equipo de la Universidad de Vigo, a José Manuel Guisan y su equipo del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica de Madrid y a José María Sánchez-Montero, **Chami**, **Isidoro**, Andrés, José Vicente y compañía del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de Madrid por su acogida cuando estuve allí. También me gustaría acordarme de Ernst Wehtje (you really saved my life!).

A toda la fauna del Koko, y a los buenos ratos de mi vida que han pasado allí.

A los héroes (definidos por Alexis Máquina), a SK o **RB**, a los hermanos Gallagher y a la lluvia

ÍNDICE

0. Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
1.1. El papel de las lipasas en la Biotecnología.....	3
1.1.1. Enzimas. Definición de lipasas: actividad lipolítica y esterásica	3
1.1.2. Fuentes de obtención de lipasas. Especificidad	5
1.1.3. Reacciones catalizadas por lipasas.....	6
1.1.4. Aplicaciones biotecnológicas de las lipasas.....	8
1.2. Precedentes en la producción de lipasas.....	11
1.3. Métodos de purificación y caracterización de proteínas.....	12
1.3.1. Métodos de concentración de proteína.....	12
1.3.2. Métodos de precipitación.....	14
1.3.3. Cromatografía.....	16
1.3.3.1. Cromatografía de intercambio iónico	17
1.3.3.2. Cromatografía de filtración en gel.....	17
1.3.3.3. Cromatografía hidrofóbica.....	19
1.3.3.4. Cromatografía de afinidad.....	21
1.3.3.5. Cromatoenfoque.....	22
1.3.4. Electroforesis.....	22
1.3.5. Electroforesis capilar.....	23
1.4. Lipasas de <i>Candida rugosa</i>	26
1.4.1. Estructura y mecanismo de reacción.....	26
1.4.2. Isoformas presentes.....	27
1.4.3. Purificación de las isoformas presentes en <i>Candida rugosa</i>	29
1.4.4. Diferencias entre reactividad entre las isoformas.....	32
1.4.5. Obtención de una lipasa de propiedades catalíticas reproducibles ..	33
1.5. Utilización de enzimas en medio orgánico.....	35
1.5.1. Introducción. Ventajas y desventajas.....	35
1.5.2. Elección del disolvente. Influencia del agua.....	36
1.5.3. Inmovilización de enzimas.....	37

1.5.3.1. Introducción.....	37
1.5.3.2. Técnicas de inmovilización de enzimas.....	38
1.5.3.3. Selección de la técnica de inmovilización.....	41
1.6. Bioreactores enzimáticos.....	43
1.6.1. Reactores ideales. Distribución de tiempo de residencia (DTR).....	43
1.6.2. Modelos de flujo.....	46
1.6.2.1. Modelo de dispersión axial.....	46
1.6.2.2. Modelo de tanques en serie.....	47
1.6.2.3. Modelos compartimentados.....	47
1.6.3. Tipos de reactores enzimáticos.....	48
1.6.4. Procesos industriales enzimáticos.....	51
1.7. Utilización de lipasas.....	53
1.7.1. Inmovilización de lipasas.....	53
1.7.2. Cinéticas enzimáticas para lipasas.....	58
1.7.3. Bioreactores con lipasas.....	61
1.7.4. Formas de expresar y calcular la enantioselectividad.....	64
1.7.5. Resolución de ácidos 2-aril propiónicos con lipasas.....	66
1.7.5.1. Precedentes.....	66
1.7.5.2. Factores que afectan a este tipo de reacciones.....	68
1.7.6. Resolución de <i>trans</i> -2-fenil-ciclohexanol con lipasas.....	80
1.8. Valoración económica de procesos.....	81
1.8.1. Estimación de las partidas necesarias.....	81
1.8.2. Cálculo de Net Cash Flow (NCF) y Rent Discounted Cash Flow (RDCF).....	83
2. Objetivos.....	85
3. Materiales y métodos.....	87
3.1. Metodología experimental.....	87
3.1.1. Fermentación.....	87
3.1.1.1. Montaje experimental de la fermentación.....	87
3.1.1.2. Medio y reactivos de la fermentación.....	88
3.1.1.3. Mantenimiento de la levadura y sistema de inóculos.....	89
3.1.2. Separación.....	90

3.1.3. Cromatografía en FPLC.....	91
3.1.3.1. Cromatografía de intercambio iónico.....	91
3.1.3.2. Cromatografía de gel filtración.....	92
3.1.3.3. Cromatografía de interacción hidrofóbica.....	93
3.1.4. Electroforesis.....	93
3.1.5. Reacciones no quirales.....	94
3.1.5.1. Reacciones de hidrólisis.....	94
3.1.5.2. Reacciones de síntesis.....	94
3.1.6. Inmovilización.....	94
3.1.6.1. Inmovilización sobre Celita y Poliamida.....	94
3.1.6.2. Inmovilización sobre Duolite.....	95
3.1.6.3. Inmovilización sobre EP100.....	95
3.1.7. Reacciones quirales.....	95
3.1.8. Diseño de experimentos.....	97
3.1.9. Montaje de las reacciones en continuo.....	97
3.2. Métodos de análisis.....	98
3.2.1. Fermentación y purificación.....	98
3.2.1.1. Determinación de la biomasa por peso seco.....	98
3.2.1.2. Test de actividad lipolítica por método turbidimétrico.....	98
3.2.1.3. Análisis colorimétrico de la actividad esterásica.....	99
3.2.1.4. Análisis de proteína total por el método de Lowry.....	99
3.2.1.5. Análisis de proteína total por el método de Bradford.....	100
3.2.1.6. Determinación de los polisacáridos totales por el método de la Antrona.....	101
3.2.2. Reacciones con lipasas.....	102
3.2.2.1. Análisis de ácido propiónico por Cromatografía de Gases.....	102
3.2.2.2. Análisis de propionato de n-butilo por Cromatografía de Gases.....	103
3.2.2.3. Análisis de hexanol por Cromatografía de Gases.....	104
3.2.2.4. Análisis de butanol por HPLC.....	105
3.2.2.5. Análisis de enantiómeros de ibuprofeno por HPLC.....	106

3.2.2.6. Análisis de enantiómeros del ácido 2-fenil-propiónico por HPLC.....	107
3.2.2.7. Análisis de enantiómeros de <i>trans</i> -2-fenil-1-ciclohexanol por HPLC.....	108
4. Resultados y discusión.....	109
4.1. Producción de la lipasa UAB.....	109
4.1.1. Estrategia de fermentación.....	109
4.1.2. Determinación de la ley de adsorción de lipasas sobre el ácido oleico.....	111
4.1.3. Conclusiones.....	120
4.2. Separación de la lipasa UAB.....	121
4.2.1. Obtención de un concentrado líquido de lipasas UAB.....	121
4.2.2. Obtención de una lipasa UAB sólida.....	124
4.2.2.1. Precipitación con etanol.....	124
4.2.2.2. Precipitación con sulfato amónico.....	125
4.2.2.3. Liofilización directa.....	127
4.2.3. Conclusiones.....	129
4.3. Estimación económica del proceso de producción de lipasas UAB.....	131
4.3.1. Partidas que componen la estimación económica.....	131
4.3.1.1. Ventas (V).....	131
4.3.1.2. Inmovilizado (I).....	131
4.3.1.3. Costes.....	133
4.3.1.4. Amortización.....	136
4.3.1.5. Capital circulante.....	136
4.3.2. Cálculo de la rentabilidad.....	137
4.3.3. Conclusiones.....	138
4.4. Caracterización de la lipasa UAB y comparación con lipasas comerciales de Sigma 1754-tipo VII.....	139
4.4.1. Determinación de las proteínas presentes en la lipasa UAB.....	139
4.4.2. Separación de las distintas proteínas presentes.....	144
4.4.2.1. Cromatografía de intercambio iónico.....	144

4.4.3.2. Cromatografía de gel filtración. Relación lipasa-polisacárido.....	147
4.4.3.3. Cromatografía de interacción hidrofóbica: separación de bandas 3 y 4.....	149
4.4.3. Conclusiones.....	155
4.5. Utilización de la lipasa UAB libre en reacciones de síntesis no quirales...	157
4.5.1. Esterificación del ácido propiónico con alcoholes lineales.....	157
4.5.2. Conclusiones.....	162
4.6. Inmovilización de la lipasa UAB.....	163
4.6.1. Necesidad de inmovilizar la lipasa UAB.....	163
4.6.2. Inmovilización por adsorción.....	163
4.6.2.1. Inmovilización sobre celita y poliamida.....	164
4.6.2.2. Inmovilización sobre Duolite.....	167
4.6.2.3. Inmovilización sobre EP100.....	170
4.6.3. Inmovilización por unión covalente.....	172
4.6.4. Conclusiones.....	174
4.7. Utilización de la lipasa UAB inmovilizada en reacciones de síntesis quirales.....	175
4.7.1. Elección de las reacciones.....	175
4.7.2. Condiciones de reacción. Elección de la enzima.....	177
4.7.3. Comparación entre lipasa UAB y Lipozyme® IM20.....	178
4.7.4. Conclusiones.....	182
4.8. Estudio de la esterificación enantioselectiva de ibuprofeno mediante Lipozyme® IM20.....	185
4.8.1. Metodología general.....	185
4.8.2. Determinación de los factores que influyen en la reacción.....	186
4.8.3. Diseño de experimentos.....	188
4.8.4. Determinación de la cinética de reacción.....	199
4.8.5. Selección de tipo de reactor en continuo: RCFP o RCTA.....	205
4.8.6. Estudios en un RCFP.....	207
4.8.7. Comportamiento del agua en el sistema.....	212
4.8.8. Estudio hidrodinámico del RCFP: DTR.....	215

4.8.9. Conclusiones.....	223
4.9. Estudio de la esterificación enantioselectiva de <i>trans</i> -2-fenil-1-ciclohexanol con lipasa UAB.....	225
4.9.1. Optimización de las condiciones de reacción.....	225
4.9.2. Determinación de la cinética en el óptimo.....	232
4.9.3. Elección del tipo de reactor.....	234
4.9.4. Funcionamiento del RCFP.....	235
4.9.5. Conclusiones.....	237
5. Conclusiones.....	239
6. Nomenclatura.....	241
7. Bibliografía.....	243
7.1. Referencias.....	243
7.2. Bibliografía electrónica.....	262
8. Apéndices.....	263
8.1. Calibrado de la actividad lipolítica.....	263
8.2. Calibrado de actividad esterásica.....	264
8.3. Calibrado de proteína total por el método de Lowry.....	265
8.4. Calibrado de proteína total por el método de Bradford.....	266
8.5. Calibrado de polisacáridos por el método de la Antrona.....	267
8.6. Calibrado de ácido propiónico por cromatografía de gases.....	268
8.7. Calibrado de propionato de n-butilo por cromatografía de gases.....	269
8.8. Calibrado de hexanol por cromatografía de gases.....	270
8.9. Calibrado de butanol por HPLC.....	271
8.10. Análisis de ibuprofeno por columna de HPLC quiral.....	272
8.11. Análisis de ácido 2-fenilpropiónico por columna de HPLC quiral.....	273
8.12. Análisis de <i>trans</i> -2-fenil-1-ciclohexanol por columna de HPLC quiral ..	274
8.13. Cromatografía en FPLC.....	275
8.14. Diseño de experimentos.....	276
8.15. Programa de control de la microbureta.....	280

0. RESUMEN

0. RESUMEN

En esta memoria se presentan los resultados obtenidos en el estudio de la aplicación de las lipasas producidas por *Candida rugosa* mediante fermentación en la resolución de compuestos quirales de interés farmacéutico por medio de reacciones de **esterificación** en medio orgánico.

En el presente trabajo se ha iniciado la separación de lipasas producidas por fermentación de *Candida rugosa* creciendo sobre ácido oleico en un proceso fed-batch a escala planta piloto, consiguiéndose una lipasa claramente superior en términos de actividad lipolítica a los preparados comerciales proporcionados por Sigma y Amano. La recuperación de un preparado sólido conteniendo estas lipasas (denominado lipasa **UAB**) se realizó por métodos sencillos y fácilmente escalables como centrifugación, filtración, **ultrafiltración** y **liofilización**, que originaron recuperaciones de actividad superiores al 90 %. Al mismo tiempo, se presenta una evaluación económica preliminar del proceso.

Se ha conseguido la caracterización de las proteínas presentes en el preparado sólido final, describiéndose la presencia de dos isoenzimas correspondientes a dos genes de lipasa de *Candida rugosa*. También se ha descrito la presencia de al menos dos proteínas de naturaleza esterásica, que se han conseguido purificar mediante la implementación de un sistema de purificación por cromatografía hidrofóbica y de intercambio iónico utilizando la tecnología FPLC.

Se ha comprobado la potencialidad del uso de la lipasa UAB en reacciones de síntesis con substratos de naturaleza no quiral, originando resultados similares a los de las lipasas comerciales de *Candida rugosa* de Sigma y Amano.

Se ha estudiado la inmovilización de la lipasa UAB sobre distintos soportes: celita, **poliamida**, duolite, toyopearl y EP100, resultando el mejor soporte el EP100, con el que se obtiene un biocatalizador de actividad comparable al producto Lipozyme® **IM20** de Novo

Nordisk (que corresponde a lipasa de *Mucormiehei* inmovilizada sobre duolite) en reacciones de síntesis no quiral.

Se ha estudiado la utilización de la lipasa UAB inmovilizada sobre EP100 en la resolución de substratos de naturaleza quiral de interés farmacéutico (antiinflamatorios no esteroideos) como el ácido 2-fenil propiónico y el ibuprofeno mediante esterificación con butanol en isooctano. En ambos casos la lipasa UAB originó resultados superiores en enantioselectividad pero inferiores en velocidad de síntesis cuando se comparó a Lipozyme IM20. También se ha estudiado la resolución de *trans*-2-fenil-ciclohexanol (intermediario para la producción de otros compuestos quirales) con ácido propiónico en isooctano, en cuyo caso sólo con la lipasa UAB se obtuvo una resolución satisfactoria.

Se ha desarrollado un sistema en continuo para la resolución altamente enantioselectiva de ibuprofeno utilizando Lipozyme IM20. La determinación de las condiciones óptimas de reacción se realizó mediante un diseño de experimentos factorial. El sistema en continuo propuesto consiste en un reactor de lecho fijo con flujo pistón que mostró un funcionamiento óptimo durante 100 horas de operación. Mediante técnicas de distribución de tiempo de residencia se estudió el comportamiento hidrodinámico del reactor demostrando estar próximo a un flujo pistón ideal.

El sistema en continuo también se utilizó con éxito en la resolución altamente enantioselectiva de *trans*-2-fenil-ciclohexanol utilizando lipasa UAB inmovilizada sobre EP100. La determinación de las condiciones óptimas de reacción se realizó de nuevo mediante un diseño de experimentos factorial.

I. INTRODUCCION

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El papel de las lipasas en la Biotecnología

1.1.1. Enzimas. Definición de lipasas: actividad lipolítica y esterásica

Una de las aplicaciones más comunes de la Biotecnología es la producción y utilización de enzimas. Las enzimas son sustancias de naturaleza proteica y como biocatalizadores presentan grandes ventajas sobre los catalizadores químicos más comunes como son su mayor especificidad y selectividad, principalmente debido al hecho de que son catalizadores ópticamente selectivos, además de trabajar en condiciones de reacción cercanas a las que se encuentran en medios fisiológicos, al contrario de la mayoría de reacciones químicas convencionales. Este hecho implica, además, la ausencia de productos secundarios con la consiguiente simplificación, a priori, de las etapas de separación y purificación.

Por el contrario, las enzimas presentan una serie de inconvenientes como son su elevado coste y su poca estabilidad en medios y condiciones alejadas de las fisiológicamente habituales, en particular, es marcada la dependencia de la actividad de una enzima con factores ambientales como temperatura, presión o pH y operacionales como agitación, aireación, etc. Por otro lado, la presencia de inhibiciones que **modifican** la actividad **enzimática**, obliga a trabajar habitualmente a concentraciones de substratos y productos bajas, lo que muchas veces provoca un encarecimiento de la etapa de **purificación** del producto de interés.

Las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas: EC. 3.1.1.3) pertenecen a un grupo de enzimas **hidrolíticos** cuya función biológica es catalizar la hidrólisis de **triglicéridos** para obtener como productos finales ácidos grasos libres y glicerol o productos intermedios como mono o diglicéridos. En la figura 1.1 se puede observar cual sería la reacción natural de las lipasas en medio acuoso.

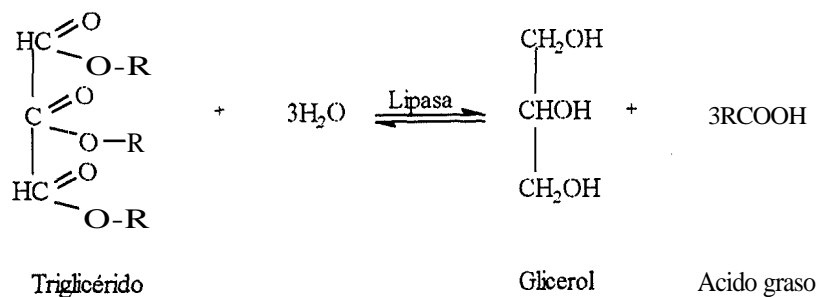


Fig. 1.1.: Acción típica de las lipasas hidrolizando un triglicérido.

En la naturaleza, las lipasas actúan en la interfase orgánico-acuosa, y su modelo cinético normalmente no se ajusta a cinéticas del tipo Michaelis-Menten siendo generalmente mucho más complejo (Verger *et al.*, 1990). De hecho, la característica claramente diferenciada de las lipasas con respecto a otros enzimas que también pueden hidrolizar esteres como las esterasas es la necesidad de una interfase orgánico-acuosa para realizar dicha función catalítica.

Los substratos propios de las lipasas son esteres insolubles y cuando la enzima actúa en esta interfase orgánico-acuosa se habla de **actividad lipolítica** y su cinética no puede ser descrita por el modelo clásico de Michaelis-Menten. En el caso de la actividad lipolítica normalmente se produce un fenómeno de adsorción inicial sobre la fase orgánica, al que sigue la reacción propiamente dicha sobre la interfase, con la formación de complejo **enzima-substrato** y posterior liberación de los productos a la fase acuosa con la posterior regeneración de la enzima (Jaeger *et al.*, 1994).

En el caso de la **actividad esterásica** la situación es completamente diferente puesto que las esterasas catalizan hidrólisis de esteres solubles, trabajando sin interfase y pudiendo describirse su cinética mediante modelos de Michaelis-Menten. En este punto, es necesario señalar que la mayoría de lipasas son también esterasas, sin embargo, no ocurre lo mismo con las esterasas, que no suelen catalizar reacciones con substratos insolubles, precisamente por la necesidad de trabajar en la interfase.

1.1.2. Fuentes de obtención de lipasas. Especificidad

Si bien la primera fuente de obtención de las lipasas fue a partir de páncreas de mamíferos (cerdos generalmente) en la actualidad se obtienen vía fermentativa a partir de una amplia variedad de microorganismos entre los que se encuentran bacterias (Jaeger *et al.*, 1994), levaduras y hongos (Rapp y Backhaus, 1992). En particular, las lipasas producidas por bacterias, como las producidas por las especies *Pseudomonas*, las producidas por hongos que pertenecen a las especies *Penicillium*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Geotrichum* y las de levaduras como distintas especies de *Candida* son las más destacadas en cuanto a producción industrial.

La producción de lipasas a partir de cada uno de los microorganismos depende en gran medida de factores ambientales, como temperatura o pH, composición del medio de fermentación: fuentes de carbono, nitrógeno, concentración de sales inorgánicas, así como porcentaje de oxígeno disuelto, pudiendo estos factores alterar la estructura de la enzima y la relación lipasa extracelular/intracelular. Las condiciones habitualmente utilizadas son: temperatura alrededor de los 30°C, pH en zona neutra y condiciones aerobias. Como fuente de carbono se suele utilizar una fuente mixta compuesta por un glúcido y un lípido, actuando este último como inductor para la producción de lipasas. Como fuente de nitrógeno se suele utilizar urea o sales inorgánicas de amonio.

En el Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona se han estudiado los diversos factores que afectan a la fermentación de *Candida rugosa* para la producción de lipasas. Se estudiaron fuentes de carbono mixtas (Valero *et al.*, 1991) destacando un crecimiento óptimo en aceite de oliva y constatándose el efecto inhibitorio de la glucosa sobre la producción de lipasas. Posteriormente se estudió el efecto de introducir los componentes del aceite de oliva, glicerol y ácido oleico, por separado (Del Río *et al.*, 1990) observándose que se producía un crecimiento diauxico en el cual primero se consumía el glicerol y después el ácido oleico, en cuya fase se producía la producción de la enzima. Finalmente se eligió el ácido oleico como substrato de entre los distintos ácidos grasos probados (Obradors *et al.*, 1993). Actualmente se trabaja con ácido oleico como única fuente de carbono y se ha desarrollado un modelo matemático estructural para describir el crecimiento de *Candida rugosa* y la producción de lipasas (Montesinos *et al.*, 1995).

Recientemente se ha constatado el efecto que sobre la producción de lipasas tiene el tamaño de la gota de ácido oleico (Dalmau *et al.*, 1998) y su importancia como criterio de escalado en operaciones de producción de lipasas a escala piloto.

Por otro lado, la especificidad de las lipasas está directamente relacionada con el microorganismo productor de las mismas. De acuerdo con esto, existen lipasas no específicas, es decir, aquéllas que hidrolizan el triglicérido en cualquiera de sus posiciones, obteniéndose como productos intermedios (1,2)(2,3)(1,3) diglicéridos y monoglicéridos. A este grupo pertenece la lipasa de *Candida rugosa* y la de *Candida curvata* (Rose y Harrison, 1989). Por lo que se refiere a lipasas específicas, dicha especificidad puede ser de dos tipos:

- 1) Posicional: cuando se hidrolizan preferentemente ciertas posiciones del triglicérido, normalmente las posiciones 1 y 3 que son las más accesibles, por ejemplo, pertenecen a este tipo las lipasas producidas por *Yarrowia lipolytica*, *Candida deformans*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus japonicus* y *Rhizopus delemar* (Macrae, 1983; Macrae y Hammond, 1985; Rose y Harrison, 1989).
- 2) De ácido graso: cuando se cataliza la hidrólisis de un determinado tipo de ácido graso particular de un triglicérido. Ejemplos de este tipo son las lipasas de *Penicillium cyclopium*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, y *Geotrichum candidum* (Borgström y Brockman, 1984; Sidebottom *et al.*, 1991).

1.1.3. Reacciones catalizadas por lipasas

El interés de algunos tipos de lipasa es consecuencia de su acción específica sobre unos enlaces químicos determinados. Esto permite una amplia serie de aplicaciones como la resolución de compuestos quirales y la obtención, con un alto rendimiento, de ácidos grasos de elevada pureza a partir de aceites y grasas. En general, las lipasas también catalizan otras reacciones no necesariamente lipolíticas, lo que hace que esta enzima tenga una amplia utilización en reacciones muy diversas.

Otras aplicaciones muy interesantes vienen dadas por la capacidad de estas enzimas de

catalizar la reacción inversa lo que permite la síntesis de ésteres, la **transesterificación** y la **interesterificación** (Jaeger *et al.*, 1994). En estos últimos casos citados la concentración del agua en el medio será un parámetro clave para desplazar el equilibrio hacia la síntesis de los productos de interés, siendo muy comunes los sistemas de eliminación continua del agua formada durante la reacción (Kwon *et al.*, 1995).

La transesterificación se define como una reacción de síntesis en la cual el acil donador es un éster, y se distinguen dos tipos de **transesterificaciones**, glicerólisis y alcoholólisis, según sea el glicerol o un alcohol el acil receptor. En la figura 1.2 se puede observar el mecanismo de la transesterificación.

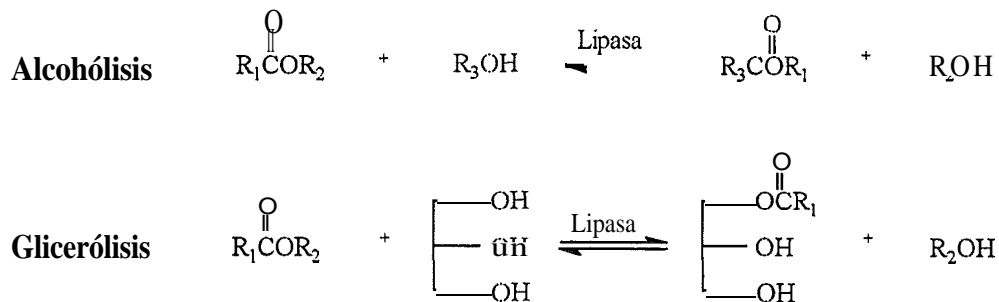


Fig. 1.2.: Tipos de transesterificaciones con lipasas.

Por otro lado, la **interesterificación** es un proceso útil para cambiar la composición de ácidos grasos en un enlace éster, en el cual el grupo acil se intercambia entre un éster y un ácido graso (acidólisis) o entre dos ésteres como se presenta en la figura 1.3.

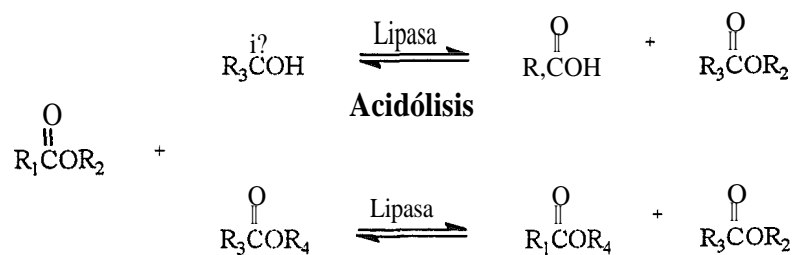


Fig. 1.3.: Tipos de interesterificaciones con lipasas.

1.1.4. Aplicaciones biotecnológicas de las lipasas

Las aplicaciones biotecnológicas clásicas con interés industrial de las lipasas están íntimamente ligadas a los distintos tipos de reacciones que son capaces de llevar a cabo, así pues, se tienen distintas posibilidades:

a) Reacciones de hidrólisis:

- Hidrólisis de aceites vegetales en la industria oleoquímica (Piazza, 1991).
- Producción de aromas y sabores para la industria alimentaria,
- Inclusión en detergentes para la eliminación de manchas de grasas.
- Finalidades analíticas para la determinación de la estructura de triglicéridos.
- Resolución de mezclas quirales (Ushio *et al.*, 1992).

b) Reacciones de síntesis:

- Síntesis de triglicéridos (Ergan y Trani, 1991).
- Síntesis de precursores de péptidos (Matos *et al.*, 1987).
- Producción de esteroides para la industria farmacéutica.
- Resolución de mezclas racémicas de alcoholes en la industria farmacéutica (Hedström *et al.*, 1993).
- Síntesis de alcoholes terpénicos como saborizantes (Nishio *et al.*, 1987).
- Síntesis de esteres glucídicos para la industria cosmética (Seino *et al.*, 1984).

c) Reacciones de interesterificación:

- Variación de la composición de ácidos grasos en mezclas de triglicéridos (Wisdom *et al.*, 1987).
- Eliminación de ácidos grasos responsables de causar la inestabilidad en el sabor de ciertos aceites y mantequillas (Kaimal y Saroja, 1988).

d) Reacciones de transesterificación:

- Preparación de compuestos enantioméricamente puros (Santaniello *et al.*, 1993).
- Transesterificaciones enantioselectivas dobles (Theil y Bjorkling, 1993).

Actualmente, el estudio de las lipasas se encamina a una serie de aplicaciones de química **fina** de interés fundamentalmente farmacéutico, básicamente en el campo de la resolución de compuestos quirales. Las normativas de legislación en las que se tiende a exigir productos ópticamente puros en lugar de mezclas racémicas están provocando un gran esfuerzo de investigación en el campo de las lipasas como biocatalizadores enantioméricamente activos. Algunos de los trabajos en los que se está haciendo particular hincapié son:

- Preparación de **cicloalcanos** enantioméricamente puros como intermediarios de reacciones de interés farmacológico (Taylor *et al.*, 1997).
- Síntesis enantioselectiva de **α -Amino- β -hidroxi ácidos** como productos para elucidar estructuras tridimensionales de proteínas y péptidos (Sutherland y Willis, 1997).
- Preparación de **análogos de hormonas** enantioméricamente puros (Nishizawa *et al.*, 1997).
- Preparación de **enantiómeros** puros del ácido **2-aril-propiónico**, como ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, etc. de utilidad farmacológica como antiinflamatorios (Botta *et al.*, 1997; Chang y Tsai, 1997).
- Síntesis altamente **diastereoselectiva** de **p-Lactonas** como intermediarios para la producción de compuestos quirales (Yang *et al.*, 1997).
- Producción de agentes **antipsicóticos** como derivados de **butirofenonas** enantioméricamente puros (Gil *et al.*, 1997).
- Síntesis de **piranonas** ópticamente puras, útiles en ciertas reacciones quirales como adiciones cíclicas (Van den Heuvel *et al.*, 1997).
- Resolución cinética de **alcoholes secundarios** (Legros *et al.*, 1997; Ljubovic and Sunjic, 1997).
- Preparación de quinonas diterpenoides útiles en el tratamiento de la artritis (Yamamura *et al.*, 1997).
- Producción de **biosurfactantes** como ácido araquidónico de aplicación en la industria de la alimentación, cosmética y farmacéutica (Ward *et al.*, 1997).
- Preparación de **etanolaminas** ópticamente activas de interés fisiológico en medicina (Furutani *et al.*, 1997).

- Bioconversión de **triglicéridos** con ácidos grasos poliinsaturados a **hidroperóxidos** de alta reactividad en la industria alimentaria (Gargouri y Legoy, 1997).
- Síntesis de productos **antitumorales** como **acetomicina** (Kinderman y Feringa, 1998).
- Síntesis de **amidas** quirales a partir de mezclas racémicas de esteres de amidas (De Castro y Gago, 1998).
- Síntesis de **antioxidantes** derivados de la vitamina E (**benzofuraniles**) para el tratamiento de ciertas enfermedades (Ayers *et al.*, 1997).
- Transesterificación de 1,3-propanodiolos para la construcción de 3-acetoxipropanoles usados en la síntesis de **alcaloides** (Fadel y Arzel, 1997).
- Síntesis de **compuestos fluoroorgánicos** de interés en medicina y biología en síntesis de **biomoléculas** (Goj *et al.*, 1997).
- Preparación de cianocicloalcanoles para la posterior producción de **1,3-heterociclos** (Forro *et al.*, 1997).
- Construcción de **biosensores**, por ejemplo, para la determinación de ácidos grasos en alimentos (Schoemaker *et al.*, 1997).
- Producción de **peroxi ácidos** importantes en síntesis orgánica y en la industria química (Klaas y Warwel, 1997).
- Resolución de **antibióticos** como nitroimidazoles (Skupin *et al.*, 1997).

1.2. Precedentes en la producción lipasas

Hace aproximadamente 12 años que en el Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona se comenzó una nueva línea de investigación con el título general de **monitorización** y control de biorreactores. Uno de los procesos escogidos para la **monitorización** y el control del mismo fue la producción de lipasas por *Candida rugosa*.

A lo largo de estos años se han realizado avances importantes en la producción de la enzima, siempre trabajando con la cepa de colección sin alterarla genéticamente, a base de optimizar las condiciones ambientales del medio de fermentación (fuentes de carbono y nitrógeno, condiciones de aireación) y utilizando diferentes estrategias de operación. Todo este trabajo ha permitido el aumento de la producción de la enzima en un factor entre 50 y 75 veces. La monitorización prácticamente completa de la fermentación, consiste en el seguimiento en línea de la actividad enzimática y las velocidades de consumo de oxígeno (OUR) y de producción de CO₂ (CER) mediante espectrometría de masas. A partir de esta última medida y mediante la utilización de "software sensors" se han estimado otros parámetros clave de la fermentación como la biomasa, velocidad específica de crecimiento y sustrato consumido (Montesinos *et al.*, 1993a; Montesinos *et al.*, 1994).

Toda esta información obtenida a través de experimentos en discontinuo y continuo ha desembocado en la elaboración de un modelo matemático estructurado que describe correctamente el proceso (Montesinos *et al.*, 1995) y que ha permitido, mediante simulaciones, establecer diferentes estrategias de operación en **fed-batch** (caudal de adición constante, velocidad **específica** de crecimiento constante, relación **sustrato/biomasa** constante) como las más rentables desde el punto de vista de productividad, expectativas que han sido comprobadas **experimentalmente** (Gordillo *et al.*, 1998). Información exhaustiva del desarrollo de estos sistemas se encuentra en los trabajos de Valero (1990), Del Río (1991), Montesinos (1993b), Gordillo (1996) y Sanz (1998).

Es en este punto, en el que se tiene un gran conocimiento del sistema y una gran monitorización del mismo, en el que se plantea la recuperación de la enzima de nuestros propios caldos de cultivos y su utilización en **reacciones** de química fina,

1.3. Métodos de purificación y caracterización de proteínas

1.3.1. Métodos de concentración de proteína

Normalmente, la concentración de proteína resultante al final de una fermentación es del orden de unos pocos gramos por litro, pudiendo llegar a ser del orden de miligramos por litro. Esto impulsa a la investigación de métodos de concentración de la proteína a partir del caldo de cultivo, además de perseguir la eliminación de ciertos componentes como son la biomasa (para proteínas extracelulares, como es el caso de la lipasa de *Candida rugosa*) y la reducción de la elevada concentración de sales inorgánicas que suelen tener los medios de fermentación.

Un proceso tipo para la obtención de un producto obtenido por vía biotecnológica suele constar de las siguientes etapas (Belter *et al.*, 1988):

1. **Eliminación de insolubles:** básicamente filtración y centrifugación como operaciones unitarias, producen poca concentración y mejora de la calidad del producto.
2. **Aislamiento de productos:** etapa en la que se eliminan materiales de propiedades muy distintas al producto de interés, y donde suele ocurrir una apreciable concentración y mejora de la calidad del producto.
3. **Purificación:** donde mediante técnicas altamente selectivas se separa el producto de interés de productos de características físico-químicas similares.
4. **Cristalización:** etapa final para la obtención de un sólido de alta pureza.

En casos reales, como operaciones de separación de la **biomasa** se pueden destacar:

1. **Centrifugación:** operación unitaria sólido-líquido en la que un sólido y un líquido se separan por diferencias de densidad al aplicarles una fuerza centrífuga. La separación del sólido y el líquido puede ser tipo sedimentación al campo centrífugo o tipo filtración con filtros centrífugos.

2. **Filtración:** operación básica en la que se separan sólidos en suspensión en un líquido haciendo pasar la mezcla por un poro que es capaz de retener el sólido.
3. **Decantación:** con el mismo principio que la **centrifugación** pero los sólidos son separados por diferencia de densidad con respecto al líquido sometidos únicamente a la acción de la fuerza de la gravedad.

Una vez se dispone de una corriente libre de biomasa, se impone la tarea de reducir de forma considerable el volumen del caldo y concentrar, por tanto, el producto de interés. En esta fase, se requerirá también una disminución de la concentración de las sales u otros complementos del medio. En este campo, existen diversas operaciones de uso muy general (Deutscher, 1988):

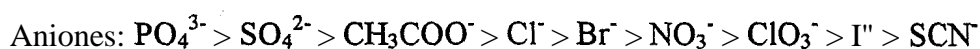
1. **Diálisis:** usada para la eliminación de componentes de bajo peso molecular, normalmente sales inorgánicas, se basa en las propiedades de una membrana semipermeable que permite el paso a moléculas de un determinado corte molecular, siendo el transporte consecuencia de una diferencia de concentración a ambos lados de la membrana.
2. **Ultrafiltración:** también basada en el uso de una membrana semipermeable con un rango definido de corte molecular, aunque a diferencia de la diálisis implica el uso de fuerza para favorecer el paso del líquido a través de la membrana, ya sea con presión, vacío o por fuerza gravitacional. Es una técnica versátil cuyo uso es aplicable desde escala de laboratorio a industrial. Las membranas de ultrafiltración deben ser estructuras sólidas, rígidas y estables a la presión de trabajo y además tener el corte apropiado para la concentración de la proteína de interés, es decir, lo más cercano posible al peso de la proteína pero asegurando la completa recuperación. Una tendencia conocida de las membranas de ultrafiltración es su capacidad de adsorber proteína en la superficie, especialmente las de celulosa, siendo recomendable el uso de membranas de polisulfona cuya afinidad química por las proteínas es mucho menor. Otro efecto conocido en la ultrafiltración es la disminución del flujo a través de la membrana con el paso del tiempo, fenómeno causado por la polarización de la membrana y que normalmente implica el lavado de las membranas con soluciones limpiadoras de carácter alcalino, o tener agitación cerca de la membrana.

3. Liofilización: se trata de la evaporación por sublimación de la solución congelada conteniendo la proteína de interés. El sistema se compone de un recipiente adecuado, una trampa fría de condensación y una bomba de vacío de elevada capacidad. Normalmente, se recomienda una rápida congelación para favorecer la estabilidad de la proteína, además de intentar aumentar la relación **superficie/volumen** expuesto al vacío para aumentar la velocidad de sublimación. El gran inconveniente de esta técnica es que no implica ningún tipo de separación excepto por lo que se refiere a compuestos volátiles, por lo que las sales y otros componentes no volátiles permanecerán en el sólido y su concentración aumentará junto con la del producto de interés.

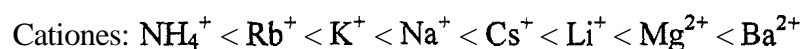
1.3.2. Métodos de precipitación

Estos métodos suelen ser un paso previo a un método específico de separación de la proteína de interés, y con ellos se suele conseguir la precipitación no selectiva de un conjunto de proteínas. Las proteínas pueden ser precipitadas causando perturbaciones en el disolvente que afecten al pH, a la fuerza iónica y a la temperatura; normalmente debido a la adición de elevadas concentraciones de ciertas sales o disolventes orgánicos miscibles.

En el caso de la adición de alguna sal inorgánica esto se asocia a que el cambio de condiciones en el disolvente provoca cambios de conformación en la proteína, básicamente la estructura de puentes de hidrógeno, con lo que se produce una neutralización de las cargas externas de la proteína por parte de la sal, originando así su precipitación. Normalmente, el aumento en la fuerza iónica del medio provoca la agregación de las proteínas. Además cada sal tendrá una fuerza iónica diferente, pudiéndose clasificar de modo cualitativo ciertos iones típicos:



← mayor efecto "salting-out"



mayor efecto caotrópico →

Aumentando el efecto de “**salting-out**” se favorecen las interacciones hidrofóbicas, mientras que el efecto caotrópico las debilita.

La adición de disolventes orgánicos suele producir cambios más importantes, ya que se produce una interacción entre los grupos hidrofóbicos del disolvente y los de la proteína provocando un cambio en la capa de hidratación de ésta pudiendo tener efectos más importantes sobre la actividad biológica de la proteína.

Como **agentes precipitantes** más importantes se pueden destacar:

1) **Sales inorgánicas:**

- **Cloruros:** de sodio, potasio y calcio.
- **Fosfatos:** de sodio y potasio.
- **Sulfatos:** de magnesio y amonio.

Entre ellos, el sulfato amónico es, sin duda, el agente precipitante de proteínas más utilizado (Jernejc y Legisa, 1996; Schaefer *et al.*, 1997) puesto que tiene una serie de características que lo convierten en óptimo:

- Su elevada solubilidad implica la precipitación de la mayoría de proteínas.
- Su bajo calor de disolución, que no implica cambios en la temperatura.
- Su baja densidad a elevada concentración, lo cual no interfiere en la posterior centrifugación.

De hecho, incluso se han desarrollado diversas técnicas de precipitación fraccionada con sulfato amónico variando la concentración de éste (Knepper *et al.*, 1998).

2) **Disolventes orgánicos:**

- Etanol (Adhirai y Selvam, 1998)
- Metanol (Kim *et al.*, 1997)

- Acetona (Minagawa *et al.*, 1997)
- Acetonitrilo (Ducharme y Farinotti, 1997)

El tratamiento con disolventes orgánicos debe realizarse con extremo cuidado en las operaciones de precipitación de proteína para obtener buenos rendimientos (Rúa *et al.*, 1993) Por ejemplo, en el caso del etanol, se requiere:

- Temperatura siempre por debajo de los 0°C.
- Agitación adecuada durante la adición del etanol.
- Etanol previamente enfriado a baja temperatura.
- Baño frío para absorber la transferencia de calor.
- Adición lenta del etanol para disminuir efectos de alta concentración local de etanol.
- Periodos de equilibración tras cada adición de etanol manteniendo la temperatura.

1.3.3. Cromatografía

La cromatografía es una técnica ampliamente desarrollada en la separación de proteínas y normalmente se usa para separar la proteína de interés del resto de proteínas o de otras sustancias que interaccionen fuertemente con la proteína como pueden ser polisacáridos u otras macromoléculas.

La cromatografía no debe de ser considerada una operación básica de separación sino un conjunto de técnicas basadas en distintos principios que permiten aislar o separar proteínas de otras moléculas de parecidas características. De acuerdo con esto, existirán diferentes cromatografías aplicables a la purificación de proteínas. La aplicación de la cromatografía para proteínas implica normalmente la utilización de instrumentación tipo FPLC ("Fast Protein Liquid Chromatography") o HPLC ("High Performance Liquid Chromatography"), de carácter normalmente analítico, aunque ambos sistemas pueden ser desarrollados a escala preparativa.

1.3.3.1. Cromatografía de intercambio iónico

El fundamento de la separación es el punto isoeléctrico (**pI**) de la proteína e implica dos pasos sucesivos, la unión de la proteína a una serie de cargas fijas, y la posterior elución de la proteína de dichas cargas por adición de una solución que vuelve a desplazar la proteína. La fase sólida suele incluir rellenos de celulosa, **dextranos**, agarosa y poliestireno, mientras que grupos funcionales típicos son DEAE (**dietilaminoetil**), CM (**carboximetil**) y PEI (**polietilenimina**). Los eluyentes pueden ser muy variados, pero normalmente se trata de sales **tamponadas** a un pH que estabilice la proteína, pudiéndose establecer gradientes de concentración del eluyente para favorecer la separación de las distintas proteínas (tecnología FPLC).

Los rellenos de columna utilizados pueden ser de intercambio amónico (relleno con carga positiva) o catiónico (relleno con carga negativa) y la elección de un relleno será función del valor de los puntos isoeléctricos de las proteínas que contenga la mezcla. En concreto, para proteínas que se hallen a un pH superior a su **pI**, la carga será negativa, con lo que tendrán que utilizarse rellenos de intercambio aniónico, y al contrario para pH inferiores al **pI**.

Esta técnica está ampliamente desarrollada para la separación de un gran rango de proteínas y es de carácter general (Breccia *et al.*, 1998; Alfonzo *et al.*, 1997; Cai *et al.*, 1998), de hecho, se ha aplicado con éxito en el campo de las lipasas (Shaw y Chang, 1989; Rúa *et al.*, 1993; Linko y Wu, 1996).

1.3.3.2. Cromatografía de filtración en gel

El fundamento de esta cromatografía es el tamaño relativo de las proteínas, pero al contrario de la cromatografía de intercambio iónico, ninguna de las proteínas es retenida en el gel de filtración de la columna. Como soporte de la columna cromatográfica se usa un lecho poroso, con un volumen interno y uno externo. Las moléculas grandes no penetran en el volumen interno y eluyen rápidamente, mientras que las pequeñas son capaces de pasar al

volumen interno y eluyen más lentamente. Este comportamiento se ilustra en la figura 1.4.

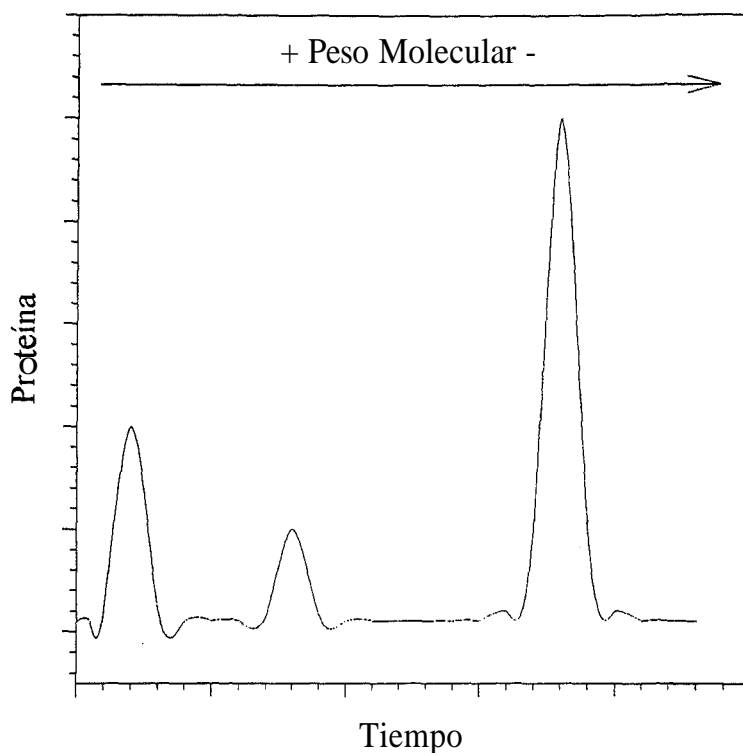


Fig. 1.4: Salida típica de una columna de filtración en gel.

De nuevo, la elección del gel a utilizar dependerá del tamaño de las proteínas que se quieran separar. Una buena indicación del tamaño molecular la da el peso molecular, aunque en ocasiones no sea directamente proporcional al tamaño ya que éste depende de otros factores como conformación tridimensional, estado de agregación, asociación con otras macromoléculas, etc. Sin embargo, y como orientación, el valor del peso molecular es el que se necesita a la hora de elegir un relleno, por ejemplo, la empresa Pharmacia Biotech tiene rangos de trabajo que van desde péptidos a proteínas de 8000 kDa, como se observa en la tabla 1.1.

La determinación del peso molecular es, por otro lado, poco compleja mediante

técnicas de electroforesis, con lo cual será un primer paso imprescindible antes de elegir esta cromatografía como posible método de separación.

Relleno	Rango de separación (kDa)
Superdex® Peptide	0.1-7
Superdex® 30	< 10
Superdex® 75	3-70
Superdex® 200	10-600
Superóse® 6	5-5000
Superóse® 12	1-300
Sephacryl® S-100	1-100
Sephacryl® S-400	20-8000

Tabla 1.1.: Rangos de separación para algunos de los rellenos de Pharmacia Biotech.

Los materiales más habituales en los que se construyen estos geles suelen ser altamente porosos, destacando matrices de agarosa, dextranos o **acrilamida** con distintas posibilidades por lo que se **refiere** a recuperación, especificidad y estabilidad.

Esta técnica es de amplia utilización en la separación de muchas proteínas que provienen de caldos de cultivo tanto a nivel de caracterización (Magnuson y Crawford, 1997; Andersson *et al.*, 1998) como a escala industrial, donde ha sido una de las técnicas cromatográficas más empleadas en la separación de proteínas (Scandella y Pettersson, 1991; Kittelberger *et al.*, 1998).

1.3.3.3. Cromatografía hidrofóbica

Como su nombre indica, esta técnica se basa en las interacciones de los grupos **hidrofóbicos** de la proteína con un soporte de naturaleza también hidrofóbica. En este caso, la forma de operar es la opuesta al caso de la cromatografía de intercambio iónico. La columna se carga con la proteína disuelta en una disolución de fuerza iónica elevada, favoreciendo así su interacción con el soporte hidrofóbico. Posteriormente, la fuerza iónica se va disminuyendo de manera que las proteínas van eluyéndose en función de su **hidrofobicidad** creciente, como se ilustra en la figura 1.5.

Los materiales utilizados para esta cromatografía suelen ser matrices de agarosa o derivados con ligandos tipo isopropil, butil, octil o fenil que son los que unen a los grupos hidrofóbicos que contienen ciertos aminoácidos que componen las proteínas. Por lo que se refiere a eluyentes, los más ampliamente usados son los basados en sales de elevada fuerza iónica, siendo el más habitual el sulfato amónico en concentraciones superiores a 1 M.

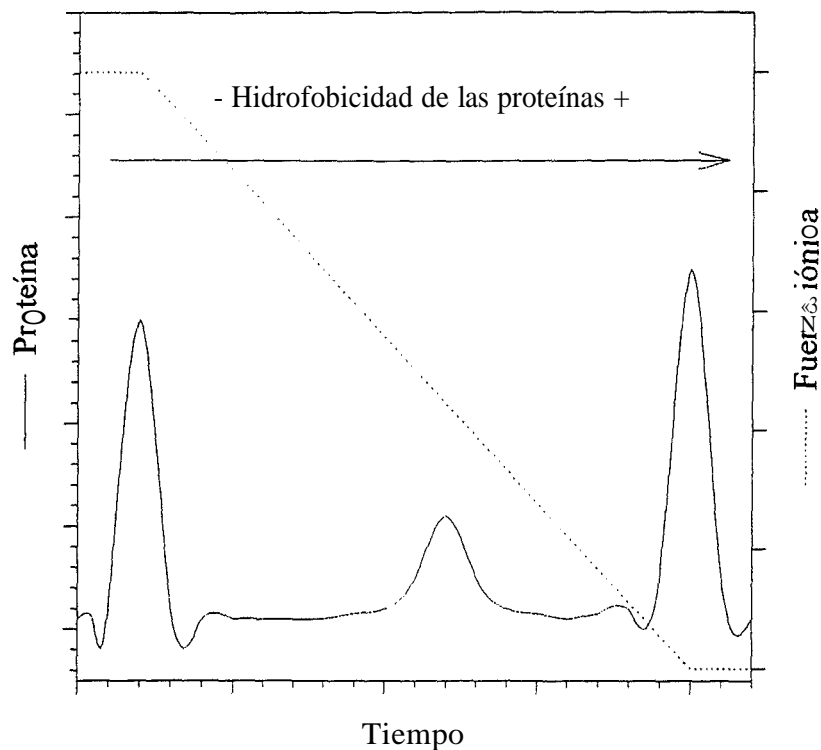


Fig. 1.5: Salida típica de una columna de interacción hidrofóbica.

Si bien esta técnica será sólo aplicable a casos en que se tenga un conocimiento de que la proteína de interés tenga un carácter hidrofóbico, hay bastantes ejemplos de aplicación de esta cromatografía en distintas proteínas (Chen *et al.*, 1997a; Scott *et al.*, 1997), habiendo sido aplicada también a la resolución de lipasas (Rúa y Ballesteros, 1994).

1.3.3.4. Cromatografía de afinidad

Se trata de la cromatografía más selectiva ya que se produce una interacción **específica** entre el soporte **cromatográfico** y la proteína de interés, siendo una técnica **bioespecífica**, puesto que se produce un "reconocimiento" del soporte hacia algún punto de la proteína, quedando así ligada al soporte. Esta técnica ha sido muy desarrollada en los últimos años y se presenta como la herramienta más poderosa para la purificación de proteínas, habiendo **infinidad** de trabajos de purificación mediante el uso de estas cromatografías de **afinidad** (Olczak *et al.*, 1997; Deane *et al.*, 1998).

Algunas de las cromatografías de **afinidad** más habituales se detallan en la siguiente lista:

- 1) **Afinidad por ciertos grupos funcionales:** como $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{CHO}$ de especial uso en la separación de péptidos.
- 2) **Afinidad por proteínas de fusión:** donde los ligandos pueden ser níquel, **IgG** para proteínas específicas que interaccionen con estos grupos.
- 3) **Afinidad por anticuerpos monoclonales y policlonales:** para la purificación de anticuerpos monoclonales y policlonales **IgG**, donde los grupos utilizados son Proteína A o G nativa o recombinante.
- 4) **Afinidad por glicoproteínas:** básicamente para glicoproteínas que contienen α -D-manosas y α -D-glucosas donde se usan como ligandos Concavalina A y diversos tipos de lectinas.
- 5) **Afinidad por enzimas:** el grupo más amplio donde existen ligandos específicos para ATPasas, desoxiribonucleasas, exonucleasas, lipasas, enzimas dependientes de NAD^+ y NADP^+ , fosfodiesterasas, proteasas y endonucleasas entre otras.
- 6) **Afinidad por otras proteínas:** como albúmina e interferon específicamente u otros grupos de proteínas como lipoproteínas, proteínas de membrana, neurotransmisores, factores de coagulación, factores de crecimiento, etc.

Esta técnica también se puede utilizar para la separación de otros tipos de **macromoléculas** como **ADN** o células (cromatografía de afinidad celular).

1.3.3.5. Cromatofoco

Basado en la carga superficial de la proteína, en este método se aplica un gradiente de pH, de manera que la carga de las moléculas está continuamente cambiando a medida que varía el pH, provocando la elución de las proteínas desde la resina a medida que alcanzan su punto isoeléctrico, es decir, el pH que neutraliza su carga superficial. Este método suele ser muy específico pero presenta el problema de que se tiene que trabajar a un pH correspondiente al pI de cada una de las proteínas que contiene la mezcla a tratar, y esto puede afectar mucho a proteínas que sean sensibles a variaciones importantes del pH.

Los rellenos utilizados son similares al caso de la cromatografía de intercambio amónico. El proceso implica empezar con un pH elevado superior al pI de las proteínas de la mezcla para posteriormente ir disminuyendo este pH y eluir las proteínas cuando se alcance cada punto isoeléctrico. Este método es aplicable para mezclas de proteínas de características conocidas (Lee *et al.*, 1997; Alfonso *et al.*, 1997).

1.3.4. Electroforesis

La electroforesis se define como la migración de macromoléculas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico, y suele emplearse casi siempre a escala de laboratorio con fines analíticos o de caracterización. Normalmente, se usa una solución de elevada fuerza iónica para concentrar e inmovilizar las proteínas, y se aplica una diferencia de potencial al gel que contiene las proteínas que migraran en función de su carga o de su peso molecular si previamente han sido igualadas las cargas.

El método más popular de electroforesis de una dimensión es el conocido por SDS-PAGE ("Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis") usado para la determinación de pesos moleculares de macromoléculas como las proteínas, que una vez dotadas de una carga equivalente, migran bajo la acción de un campo eléctrico sobre un gel en función de su tamaño molecular. Los pesos moleculares de las proteínas se determinan por comparación de sus movilidades con algunos marcadores de peso molecular conocido.

Otro método utilizado frecuentemente es el denominado Isoelectroenfoque, en esta técnica, cuando una proteína es introducida en un medio de pH variable bajo la influencia de un campo eléctrico, se mueve hacia el polo opuesto a su **carga**, pero en su migración a través del gradiente de pH, la proteína puede ganar o perder protones, de manera que su carga disminuirá y perderá movilidad, llegando hasta el punto en que el pH iguale su punto isoelectrónico. Sus aplicaciones en el campo de la caracterización de proteínas en todas sus variedades y posibilidades son muy numerosas (Deutscher, 1988; Riguetti, 1990).

1.3.5. Electroforesis capilar

La electroforesis capilar (CE) se define como una técnica de alta resolución para la separación de una amplia gama de moléculas de interés biológico como metabolitos, aminoácidos, ácidos nucleicos, glúcidos, proteínas y péptidos, aunque su mayor aplicación actualmente está en el campo del análisis de cationes y aniones (Fung y Lau, 1998a; Fung *et al.*, 1998b).

Al igual que en el caso de la electroforesis en gel, las separaciones en CE se basan en la relación **carga-masa**. La CE emplea columnas capilares de sílice que pueden ser o no derivatizadas por donde las proteínas se mueven en solución. Esta técnica puede utilizarse a modo de electroforesis en gel para determinar los pesos moleculares de las proteínas o bien, para conocer los puntos isoelectrónicos de dichas proteínas. En este último caso, conocido como isoelectroenfoque, la proteína se desplaza cuando se crea un gradiente de pH en la columna hasta pararse en el punto en el que el pH es igual al pI. Tras esto, la muestra se moviliza rompiendo el gradiente de pH o hidrodinámicamente, obteniéndose picos parecidos a los obtenidos mediante las técnicas cromatográficas tipo FPLC y HPLC.

En su forma más simple, la separación mediante CE se consigue pasando un voltaje entre dos recipientes llenos de algún tampón que están unidos por un capilar también lleno de líquido (Fig. 1.6). Esto produce la generación de lo que se conoce por flujo electroosmótico, que permite a las moléculas de interés pasar de un extremo del capilar al otro. En el caso del isoelectroenfoque, la forma más común de operar es situar en cada extremo del capilar una solución de pH ácido y básico respectivamente, aplicar potencial para crear un gradiente de

pH a lo largo del capilar que permita a las moléculas, en este caso proteínas, moverse hasta alcanzar el pH correspondiente a su punto isoeléctrico, en el que dejarán de moverse. En este punto, se iguala el pH de cátodo y ánodo situando el mismo compuesto (ácido o base) en cada extremo de la columna, de manera que se rompe el gradiente de pH, y las proteínas salen de la columna consecutivamente por su pI de acuerdo a como se hayan distribuido en la primera fase (Coligan *et al.*, 1995).

Los capilares utilizados tienen generalmente de 30 a 50 cm de largo con 50-75 μm de diámetro interno, lo que supone volúmenes del orden de microlitros. Los capilares tienen un grosor muy pequeño, lo que permite una efectiva eliminación del calor generado por los voltajes que normalmente alcanzan los 30 kV, necesarios para este tipo de separaciones. Los capilares pueden estar vacíos (normalmente en el caso del análisis de iones) pero para proteínas se recomienda el uso de capilares rellenos de los cuales en el mercado se encuentran distintos tipos cuyas diferencias suelen ser de hidrofobicidad.

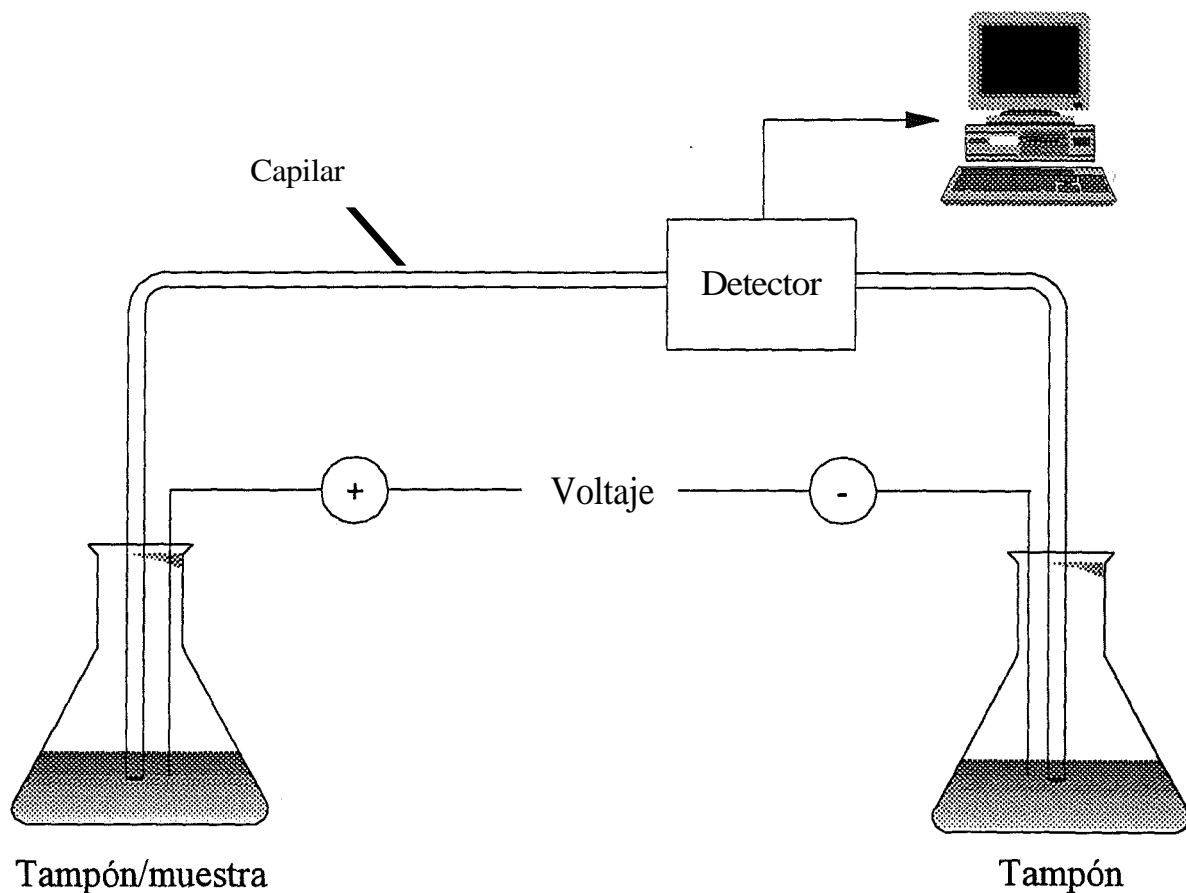


Fig. 1.6.: Esquema de una CE.

Aunque la CE ha sido aplicada con éxito en la resolución de algunas proteínas (Jin *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1997; Magnuson y Crawford, 1997; Xu *et al.*, 1997), el hecho de que esta técnica sea una de más difíciles de optimizar para tener buenas separaciones en mezclas complejas como las que provienen habitualmente de caldos de fermentación, ha provocado **que** no sea todavía un sistema de separación común en biotecnología, aunque sin embargo, es una herramienta útil en la determinación cuantitativa rápida de la pureza de ciertas muestras.

1.4. Lipasas de *Candida rugosa*

1.4.1. Estructura y mecanismo de reacción

Una de las características más importantes de las lipasas y que las diferencia de otras enzimas es la propiedad que tienen de adsorberse sobre superficies hidrofóbicas, provocando normalmente un aumento de su actividad catalítica. Este hecho, conocido como activación interfacial se explica mediante la estructura tridimensional de la enzima. Los análisis por difracción de rayos X revelan la existencia de una estructura en hélice alfa que recubre el centro activo de la enzima, y que se activa por desplazamiento de esta estructura en forma de tapa, cuyo movimiento crea una estructura apolar exponiendo los grupos catalíticos de la proteína, mientras que la superficie hidrofóbica estabiliza el contacto entre la enzima y la interfase lipídica (Brzozowski *et al.*, 1991).

Recientemente, se ha determinado la estructura de una lipasa de *Candida rugosa* en sus conformaciones cerradas y abierta (Fig. 1.7). La comparación entre ambas estructuras indica que la activación requiere el movimiento y replegamiento de un solo bucle, de manera que comporta la aparición de una superficie hidrofóbica alrededor del centro activo que permite la interacción con la interfase lipídica. Este movimiento se asocia a una isomerización de *cis* a *trans* del enlace peptídico del residuo prolina. Esta isomerización es un mecanismo de cierre en una u otra conformación, afectando a la velocidad de reorientación de la proteína en este movimiento de cierre y apertura (Grochulski *et al.*, 1993; Grochulski *et al.*, 1994).

Por lo que se refiere a la catálisis en sí, durante la reacción se forma un intermediario tetraédrico que se transforma en un complejo acil-enzima, para que posteriormente la lipasa en forma libre se regenere por la reacción hidrolítica con una molécula de agua. El mecanismo por el cual la lipasa hidroliza un enlace éster se inicia con un ataque nucleófilo por parte del oxígeno de la cadena lateral de la serina hacia el átomo de carbono del grupo carbonilo del enlace éster dando lugar a la formación de un complejo intermediario tetraédrico. La histidina incrementa el carácter nucleófilo del grupo hidroxilo de la serina, ya que su anillo imidazol se protona adquiriendo carga positiva, estabilizada gracias a la carga negativa del residuo ácido. El intermediario tetraédrico se estabiliza por puentes de hidrógeno

con los enlaces amina de los residuos que pertenecen a la cavidad de oxianión. Finalmente se libera el alcohol, quedando el complejo **acil-enzima**, y mediante el ataque **nucleófilo** de un ion **hidroxilo** se libera el ácido graso y se regenera la enzima (Grochulski *et al.*, 1993; Grochulski *et al.*, 1994).

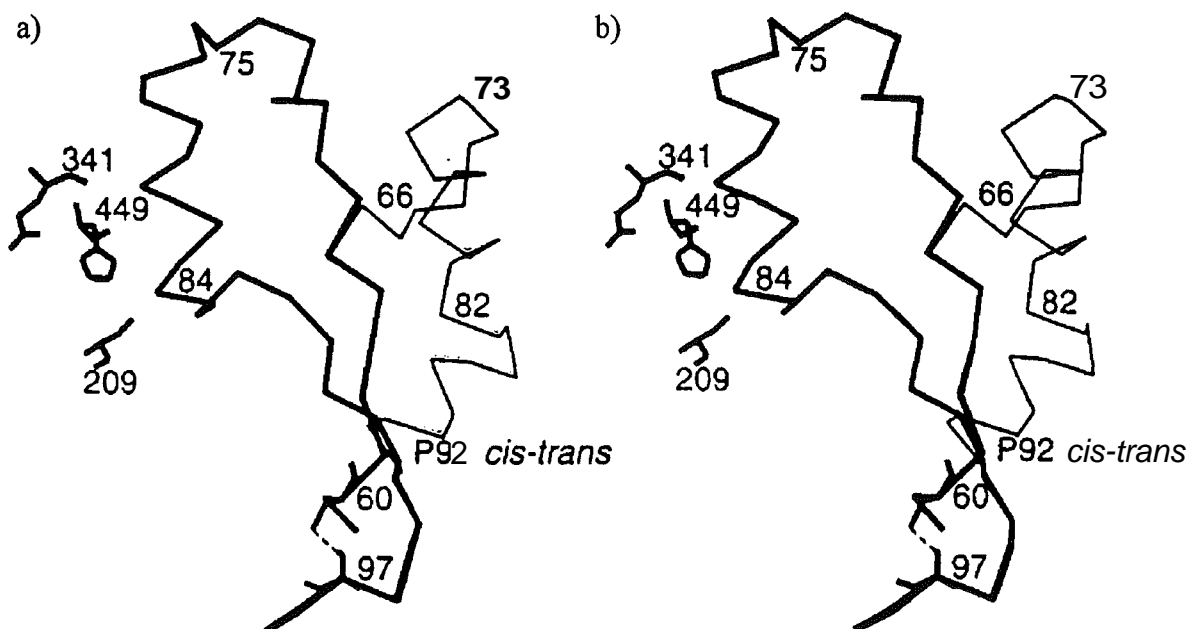


Fig. 1.7.: Conformaciones y posiciones de las dos tapas abierta (a) y cerrada (b) para lipasa de *Candida rugosa* (Grochulski *et al.*, 1994).

1.4.2. Isoformas presentes

Una de las características más importantes que hay que tener en cuenta al estudiar las lipasas de *Candida rugosa* es el hecho de que aparezcan múltiples isoformas de lipasas en los preparados comerciales de esta enzima. Al menos 7 genes distintos de lipasas, nombrados de Lip1 a Lip7 han sido descritos en *Candida rugosa*, aunque sólo 5 de ellos (Lip1-Lip5) han sido completamente caracterizados (Lotti y Alberghina, 1996). De estos 5 genes, sólo se han identificado 3 productos (los correspondientes a Lip1, Lip2 y Lip3) en los preparados comerciales de esta enzima.

A partir de estas secuencias de genes, se ha elaborado la secuencia amoniácida teórica de las diferentes isoenzimas, así como otras características como peso molecular, puntos de glicosilación teóricos y punto isoeléctrico. En la tabla 1.2 se recoge la secuencia de aminoácidos comenzando por el N-terminal de los distintos genes de lipasa de *Candida rugosa*, marcando aquellos puntos donde no coinciden, mientras que en la tabla 1.3 se incluyen las previsiones teóricas obtenidas a partir de las secuencias de la tabla 1.2.

Lip1	5	19	22	30	35	40	45-46	49
	APTA T	LANGDTITGLNAI	I NE A	FLGIPFA	E PPVG N	LRFK D	PVPY SG	SL D G
Lip2	APTA T	LANGDTITGLNAI	V NE K	FLGIPFA	E PPVG T	LRFK P	PVPY SA	SL N G
Lip3	APTA K	LANGDTITGLNAI	I NE A	FLGIPFA	E PPVG N	LRFK D	PVPY SG	SL N G
Lip4	APTA T	LANGDTITGLNAI	I NE A	FLGIPFA	Q PPVG N	LRFK P	PVPY SA	SL N G
Lip5	APTA T	LANGDTITGLNAI	I NE A	FLGIPFA	E PPVG N	LRFK D	PVPY RG	SL N G

Tabla 1.2.: Secuencia de aminoácidos para los distintos genes de lipasa de *Candida rugosa*.

Proteína	PM	pI	Puntos de glicosilación
Lip1	57223	4.5	3
Lip2	57744	4.9	1
Lip3	57291	5.1	3
Lip4	57051	5.7	1
Lip5	56957	5.5	3

Tabla 1.3.: Predicción teórica para las distintas isoformas de lipasas de *Candida rugosa*.

Las distintas secuencias descritas en la tabla 1.2 presenta hasta un 84 % de similitud, con zonas altamente conservadas que intervienen en el plegamiento y función catalítica y otras más variables cuyas diferencias marcan la especificidad de la enzima (Lotti *et al*, 1994).

1.4.3. Purificación de las isoformas presentes en *Candida rugosa*

Aunque en la bibliografía se encuentran numerosos trabajos de purificación y caracterización de las distintas isoformas de lipasas, así como de otras proteínas asociadas generalmente de naturaleza esterásica, presentes en los preparados comerciales de lipasas de *Candida rugosa*, existen muy pocos trabajos de purificación referidos a la influencia de las condiciones de cultivo y fisiología de *Candida rugosa* y su **perfil** lipásico/esterásico secretado por el microorganismo (Lotti *et al.*, 1998).

La mayoría de técnicas que se han utilizado para la separación de dichas isoformas incluyen operaciones de cromatografía de distintos tipos. Previamente a su utilización se realiza un pretratamiento o **semipurificación** de la muestra, mediante operaciones de **centrifugación**, precipitación o diálisis, para eliminar gran parte de las impurezas insolubles y solubles que contienen los preparados comerciales. Hay que destacar que en muchos de los trabajos se encuentran fracciones de proteínas que **difieren** en alguna característica, pero rara vez existe una identificación con las distintas isoformas previstas por las secuencias presentadas en la tabla 1.2.

Esto es debido a que la heterogeneidad de isoformas de lipasas encontradas en preparados comerciales puede ser debida no tanto a variaciones en la secuencia de aminoácidos sino a diferencias en la glicosilación de las proteínas, así como a asociaciones de naturaleza no covalente entre las lipasas e impurezas presentes en los caldos de fermentación, como polisacáridos de elevado peso molecular, que son **habitualmente** producidos por microorganismos productores de lipasas (Cirigliano y Carman, 1984; Cirigliano y Carman 1985).

En la tabla 1.4 se detalla una recopilación de los distintos trabajos realizados por distintos autores en la purificación de las distintas isoformas presentes en preparados comerciales. En la tabla también se indica si existe una correlación entre las fracciones obtenidas y alguna de las secuencias determinadas por Lotti *et al.* (1996) de la tabla 1.2. Esta **analogía** se realiza normalmente por determinación del **N-terminal** hasta el aminoácido distintivo de cada isoforma.

Autor	Procedencia	Fracciones	Características	Cromatografía utilizada
Veeraragavan y Gibbs (1989)	Sigma	2 (I y II)	PM=58, pI=5.6, 5.8	I. iónico
Shaw y Chang (1989)	Sigma	3 (A, B y C)	PM=62	I. iónico
Brahimi-Horn <i>et al.</i> (1990)	Sigma	2 (I y II)	PM=60, pI=4.3, 4.7	I. iónico + I. hidrofob.
Allenmark y Ohlsson (1992)	Sigma	2 (I y II)	-	I iónico + G. filtración
Rúa <i>et al.</i> (1993)	Sigma	2 (A y B) ⁽¹⁾	PM=60, pI=5.5, 4.8	I. iónico + Afinidad
Chang <i>et al.</i> , (1994)	Sigma	2	-	-
	Amano	3	-	-
	Meito Sangyo	1	-	-
Rúa y Ballesteros (1994)	Sigma	2 (A y B) ⁽²⁾	-	I. hidrofob.+ G. filtración
Gordillo <i>et al.</i> (1995)	Fermentación	2 (1 y 2)	PM=60	I. iónico
Linko y Wu (1996)	Biocatalyst	2 (1 y 2) ⁽³⁾	PM=57,60	I. hidrofob.+ G. filtración
Diczfalusy <i>et al.</i> (1997)	Sigma	3 (CEL1,2 y 3) ⁽⁴⁾	..	I. hidrofob.+ G. filtración + I. iónico
Lundell <i>et al.</i> (1998)	Sigma	2 (A y B) ⁽⁵⁾	PM=60	I. iónico

- (1) La lipasa A corresponde a Lip3 con un grado de glicosilación del 6.7 %, mientras que la lipasa B, mayoritaria, puede corresponder a Lip1,2,4 o 5, con un grado de glicosilación del 2.7 %.
- (2) Variación del método propuesto para separar las isoenzimas A y B del punto (1).
- (3) Siguiendo el protocolo descrito por Rúa y Ballesteros (1994).
- (4) CEL-1 y CEL-3 se identifican con Lip1 y CEL-2 es el producto del gen Lip2, de nuevo Lip1 aparece como mayoritaria, sin embargo, contrariamente a lo descrito por Rúa *et al.* (1993), no aparece Lip3. En este trabajo han sido identificadas proteínas de naturaleza esterásica en preparados de Sigma tipo VII (Diczfalusy y Alexson, 1996; Diczfalusy *et al.*, 1997) por medio de cromatografía hidrofóbica. Concretamente se trata de acil-CoA tioesterasas/carboxilesterasas presentes en pequeñas cantidades en el liofilizado comercial.
- (5) Siguiendo el protocolo descrito por Rúa *et al.* (1993).

Tabla 1.4.: Resumen de los trabajos de purificación realizados con lipasas de *Candida rugosa*.

Como se puede observar en la tabla 1.4, los resultados obtenidos son muy diversos y siguiendo diferentes técnicas de purificación o incluso cambiando de proveedor o de lote se obtienen distintas proporciones e incluso se identifican distintas isoenzimas. Además, en

muchas ocasiones las lipasas se presentan en forma de agregados o asociadas a otras moléculas (Shaw y Chang, 1989). Este hecho, unido a que las lipasas presentan una importante heterogeneidad en la glicosilación (Tabla 1.5), provoca que los intentos de **identificar** los picos obtenidos cromatográficamente con proteínas puras sean extremadamente **difíciles**. En la tabla 1.5 se presentan a modo de resumen aquellas purificaciones que han llegado a este tipo de identificación para la lipasa comercial de Sigma.

Proteína	PM (kDa)	pI	% Glicosilación	Autor
Lip1/B	62	4.8	3.6%	Rúa <i>et al.</i> (1993)
Lip3/A	64	5.5	8.0%	Rúa <i>et al.</i> (1993)
Lip1	60	-	-	Grochulski <i>et al.</i> (1993)
Lip1	60	-	5.0%	Diczfalusy <i>et al.</i> (1997)
Lip2	58	-	1.5%	Diczfalusy <i>et al.</i> (1997)

Tabla 1.5.: Resumen de los trabajos de purificación realizados con lipasas de *Candida rugosa* en los que se llega a una identificación de un gen descrito por Lotti *et al.* (1996).

Otro factor a tener en cuenta es que en este tipo de cromatografías normalmente los rendimientos obtenidos son muy bajos, contabilizando la actividad que se recupera en las fracciones con respecto a la de partida. Esto normalmente viene compensado por unos elevados factores de purificación que reflejan el aumento producido en la actividad específica. Por ejemplo, la tabla 1.6 proporcionada por Rúa *et al.* (1993) muestra claramente la disminución del rendimiento al mismo tiempo que el aumento del factor de purificación:

Purificación	Proteína total (mg)	Act. esp. (U/mg) (Tributirina)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Crudo	1100	65	1.0	100
Prec. etanol	500	120	1.8	84
DEAE				
Lip A	80	134	2.0	15
Lip B	154	230	3.5	49
Sephacryl				
Lip A	4.5	750	11.5	5
Lip B	20	744	11.3	21

Tabla 1.6.: Rendimientos y factores de purificación para la purificación de isoformas de *Candida rugosa* según Rúa *et al.*, 1993.

Otros datos proporcionados por Veeraragavan y Gibbs (1989) hablan de recuperaciones del orden del 20 % y factores de purificación cercanos a 6, mientras que datos de Diczfalusy y Alexson (1996) obtienen rendimientos inferiores al 20 % con factores de purificación cercanos a 20 para el mejor de los casos.

No obstante, tomando como referencia la lipasa de Sigma, se pueden postular una serie de conclusiones:

- Existe la presencia de dos isoformas, de las cuales la mayoritaria corresponde al gen **Lip1**.
- Esta forma mayoritaria correspondiente al gen **Lip1** es la denominada **LipB** por Rúa *et al.* (1993).
- En cuanto a la otra isoforma, la mayoría de autores señalan que se trata de la correspondiente al gen **Lip3**, mientras que Diczfalusy *et al.* (1997) identifican el gen **Lip2**.
- Los pesos moleculares y puntos isoeléctricos determinados experimentalmente difieren de los previstos teóricamente.
- Hay una cierta heterogeneidad en el grado de glicosilación que parece depender incluso del lote estudiado.
- Se ha constatado por parte de Diczfalusy y Alexson (1996) la presencia de al menos dos esterases en el preparado de Sigma.
- La presencia de contaminantes en la muestra, la posibilidad de agregación de las lipasas y la asociación a otras macromoléculas dificulta la purificación de esta lipasa.

1.4.4. Diferencias de reactividad entre las isoformas

Existen pocos estudios donde se haya determinado distinta reactividad entre las dos isoformas mayoritarias presentes en las lipasas comerciales de *Candida rugosa*. De todas formas, los primeros estudios realizados por Shaw y Chang (1989) sugerían que había diferencias en la actividad enzimática de las distintas fracciones separadas al variar la longitud de la cadena del grupo **acilo** del éster que se hidrolizaba. Estos resultados fueron confirmados por Brahim-Horn *et al.* (1989) cuando se comparó la actividad esterásica de ambas fracciones y por Rúa *et al.* (1993), ya que cuando separaron las lipasas A y B (que por primera vez

correspondían a dos genes identificados para *Candida rugosa*), se llegó a la conclusión de que la lipasa B presentaba menor afinidad por sustratos solubles (*p*-nitrofenil butirato, actividad esterásica) y por triglicéridos de cadena corta (tributirina) que por sustratos de naturaleza lipídica como **trioleína**, y que, en cambio, la lipasa A tenía más afinidad por sustratos esterásicos, además de otras diferencias importantes de tipo bioquímico como pH y temperatura óptimos, influencia de disolventes orgánicos, etc. que habían sido constatados en trabajos anteriores.

Sin embargo, Allenmark y Ohlsson (1992) fueron los primeros en probar distintas **fracciones** de lipasas en sustratos de naturaleza quiral, observando como los excesos enantioméricos obtenidos variaban en función de la fracción utilizada. Otros estudios posteriores apuntan a que en reacciones de transesterificación la lipasa B originó unos resultados mucho mejores en selectividad y conversión que la lipasa A (Linko y Wu, 1996). Sin embargo, estudios recientes (Lundell et al, 1998) no determinaron distintas **enantioselectividades** para las lipasa A y B en la resolución de alcoholes secundarios, aunque sí se detectaron diferencias en la resolución de derivados del ácido 2-fenil propiónico como ibuprofeno (Hernáiz *et al.*, 1997) donde la lipasa B se mostró mucho más **enantioselectiva**, hecho que había sido constatado previamente con este tipo de compuestos y con *p*-nitrofenil ésteres (Hernáiz *et al.*, 1995).

1.4.5. Obtención de una lipasa de propiedades catalíticas reproducibles

A la vista de lo explicado en este capítulo, las rutas para conseguir una lipasa de *Candida rugosa* que sea reproducible en su actividad catalítica son esencialmente las tres siguientes:

1. **Trabajar con isoformas puras:** sin embargo, esto presenta los problemas que se han descrito anteriormente, como son la dificultad de obtener estas isoformas y los bajos rendimientos que se originan en este tipo de procesos.

2. **Expresión en otros microorganismos:** otra posibilidad es clonar y expresar uno de los genes que codifican la producción de alguna de las isoformas de *Candida rugosa* en algún otro microorganismo huésped. Sin embargo, *Candida rugosa* no utiliza el código genético universal común a la mayoría de organismos (Kawaguchi *et al.*, 1989), cambiando el codón universal para leucina, CUG, por serina. Como consecuencia, la expresión del gen seleccionado en microorganismos como *Sacharomyces cerevisiae* origina lipasas inactivas (Fusseti *et al.*, 1996). Este problema ha sido recientemente solucionado por tres vías distintas para el gen Lip 1:

- **Expresión del gen en un microorganismo que codifique igual que *Candida rugosa*** como es *Candida maltosa* (Mileto *et al.*, 1998).
- **Mutagénesis del gen natural** de Lip1 y expresión en *S. cerevisiae* (Brocea *et al.*, 1998).
- **Síntesis químico-enzimática del gen** y expresión de éste en *S. cerevisiae* y *Pichia Pastoris* (Brocea *et al.*, 1998).

3. **Control preciso de las condiciones de fermentación:** demostrado que las condiciones de fermentación afectan a la proporción de los isoenzimas obtenidos (Gordillo *et al.*, 1998) es evidente que mediante un control de las condiciones de fermentación se obtiene un producto repetitivo. Sin embargo, el proceso de downstream y las condiciones de almacenamiento también han de estar perfectamente definidas, ya que se ha constatado con lipasas comerciales que no sólo al cambiar de lote, sino al variar el tiempo de almacenamiento, las propiedades del catalizador son variables (Tsai y Dordick, 1996b).

1.5. Utilización de enzimas en medio orgánico

1.5.1. Introducción. Ventajas y desventajas

El uso de las enzimas en medio orgánico ha tenido un gran desarrollo en los últimos años debido a que muchas de las reacciones de interés sólo pueden llevarse a cabo en este tipo de medios. Si bien es cierto que algunas propiedades de las enzimas tienden a mejorar en este tipo de medios, en general se puede postular que la actividad enzimática es menor en disolventes orgánicos que en medio acuoso.

A modo de resumen, entre las ventajas de trabajar en medio orgánico se pueden citar (Godtfredsen *et al.*, 1985; Dordick, 1991; Kvittingen, 1994):

- Aumentar la solubilidad de sustratos apolares.
- Favorecer la reacción de síntesis frente a la hidrólisis desplazando el equilibrio termodinámico.
- Eliminación de las reacciones laterales que dependen del agua.
- Alteración en sustratos y especificidad.
- Ausencia de necesidad de inmovilización, ya que las enzimas no son solubles en medios orgánicos.
- Las enzimas son fácilmente recuperables por filtración o centrifugación ya que constituyen una fase diferente del medio.
- Al tratarse de medios orgánicos, normalmente la separación del producto es más simple, debido a que los productos tienen bajo punto de ebullición.
- Mejora de la termoestabilidad.
- Eliminación de contaminación microbiana.
- Potencial uso de las enzimas para ser utilizadas directamente en un nuevo o ya existente proceso químico.
- La gran variedad de reacciones que son capaces de catalizar las enzimas en medios orgánicos.

- La posibilidad de las enzimas de actuar enantioselectivamente sobre sustratos orgánicos de naturaleza quiral.
- Las enzimas trabajan habitualmente en condiciones suaves cercanas a las fisiológicas.
- La alta selectividad con respecto al sustrato.
- Las enzimas pueden ser obtenidas por fermentación.

De la misma manera, sin embargo, el empleo de enzimas en medio orgánico presenta una serie de inconvenientes, entre los que podemos destacar (Godtfredsen *et al.*, 1985):

- Las enzimas se inactivan fuertemente por muchos disolventes orgánicos.
- Las enzimas se inactivan cuando no trabajan en zonas cercanas al pH óptimo, y en disolventes orgánicos este factor es difícil de controlar.
- Las enzimas presentan inhibición por muchos de los productos y sustratos hidrofílicos que aparezcan en la reacción.
- La mayoría de disolventes orgánicos no son aceptables desde el punto de vista medio ambiental.
- Complejidad elevada del sistema de reacción.
- Mucho menor conocimiento teórico de los mecanismos de reacción en medio orgánico, así como de los factores que afectan al diseño del reactor y modelización del proceso.
- Coste adicional del disolvente.

Así pues, la elección de un proceso enzimático en un disolvente orgánico vendrá determinada al tener en cuenta todas estas consideraciones, de entre las cuales la más importante es la actividad que presente la enzima en el disolvente utilizado.

1.5.2. Elección del disolvente. Influencia del agua

La actividad catalítica de las enzimas en medio orgánico depende en gran medida de que en estos disolventes mantengan la estructura proteica, que viene condicionada por multitud de puentes de hidrógeno que se forman entre la proteína el medio que la rodea. De hecho, una enzima presentará su actividad óptima para una conformación definida que vendrá determinada por un conjunto de interacciones de tipo puente de hidrógeno, iónicas, covalentes

e hidrofóbicas (Lehninger, 1982). Para preservar esta conformación es necesaria la presencia de lo que se denomina una capa de hidratación, cuya pérdida supone normalmente un fuerte descenso en la actividad catalítica.

Las enzimas necesitan esta capa de hidratación para realizar su actividad catalítica, sin embargo, dependerá de cada caso la cantidad de agua necesaria para preservar la capa de hidratación y en este aspecto tendrá mucha importancia el tipo de disolvente utilizado y sus características.

1.5.3. Inmovilización de enzimas

1.5.3.1. Introducción

La inmovilización de una enzima o, en general, de un biocatalizador consiste en su localización en una región definida de espacio manteniendo alguna actividad catalítica deseada. En los sistemas de inmovilización la difusión es el mecanismo predominante para el transporte de materia, es decir, donde la agitación no juega ningún papel en el transporte convectivo.

Las principales ventajas de utilizar enzimas inmovilizados son:

- Se pueden reutilizar y utilizar de forma continua.
- Permiten aumentar la concentración de enzima en el medio de reacción.
- Se facilita su separación del medio de reacción.
- Se suele producir un aumento de la estabilidad de la enzima.
- Todos estos factores suelen generar un aumento de la productividad, lo que suele desembocar en un sistema económicamente rentable.

Como desventajas principales se pueden señalar las siguientes:

- Se añade una nueva etapa en la preparación de la enzima.

- La actividad catalítica puede quedar afectada negativamente.
- Los fenómenos de difusión pueden limitar la velocidad de reacción.

En resumen, la necesidad de inmovilizar una enzima vendrá condicionada por el sistema de reacción que se requiera emplear y sobre todo, del tipo de bioreactor que se desee utilizar. En términos generales, para procesos en batch no será necesaria la inmovilización, así como para procesos en tanque agitado en continuo, en los que la agitación suele tener un efecto negativo en la integridad de las partículas. Sin embargo, para procesos en continuo tipo flujo pistón será prácticamente siempre necesario el uso de algún sistema de inmovilización. Entre estos últimos destacan sistemas en lecho fijo, lecho **fluidizado** o fibras huecas (Zaborsky, 1973; Bailey y Ollis, 1986; Mosbach, 1987).

1.5.3.2. Técnicas de inmovilización de enzimas

Los principales protocolos de inmovilización se pueden dividir en función del mecanismo en que se basan, tal como se esquematiza en la Fig. 1.8.

Adsorción

Esta es la técnica más simple y la más común y consiste en poner en contacto una disolución de la enzima en sus condiciones óptimas con un adsorbente activo. Tras un cierto tiempo, se limpia la partícula para eliminar la enzima no inmovilizada. Las fuerzas que favorecen esta interacción suelen ser de tipo iónico o hidrofóbico y en general de carácter débil.

El problema principal de la inmovilización por adsorción es la reversibilidad del proceso, dado que se trata de un proceso en equilibrio, y que el cambio en condiciones como pH y temperatura pueden provocar el desplazamiento de la enzima hacia la fase soluble. En procesos donde se trabaje con disolventes orgánicos, es el método más aconsejable puesto que no existe dicha reversibilidad.

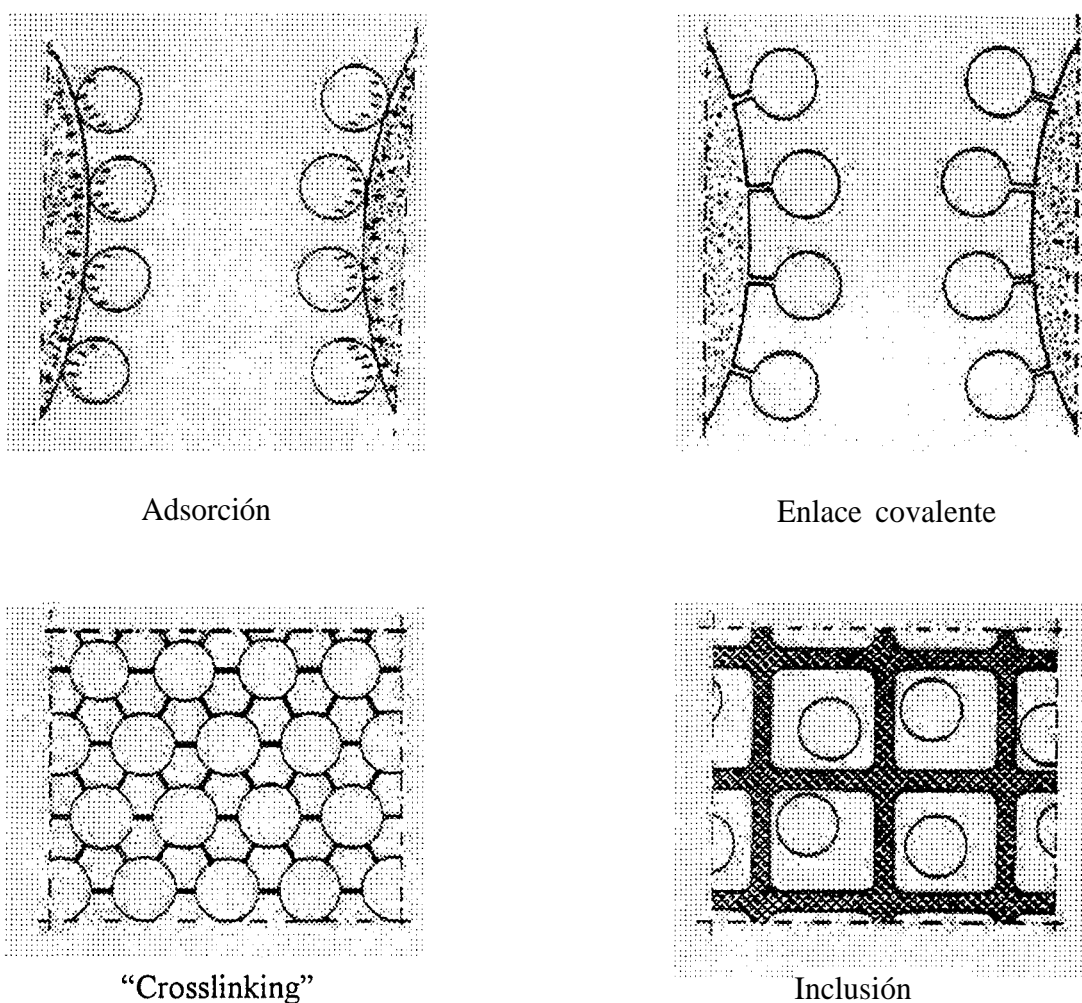


Fig. 1.8.: principales métodos de inmovilización de enzimas.

Este método se ha aplicado ampliamente para enzimas de todo tipo y en concreto para lipasas (Murray *et al.*, 1997; Knezevic *et al.*, 1998), en particular mediante el empleo de soportes que favorecen las interacciones hidrofóbicas (Bastida *et al.*, 1998).

Algunos de los soportes utilizados más comúnmente para realizar este tipo de inmovilización son: alúmina, celulosa, agarosa, concavalina A, silica gel, vidrio poroso, resinas de intercambio iónico, celitas y diversos tipos de polímeros.

Enlace covalente

En este caso, la unión enzima-soporte se realiza mediante un enlace de naturaleza covalente. Existe una gran variedad de métodos en función de la naturaleza del soporte y su grupo funcional, el grupo funcional de la enzima que interacciona con el soporte, la activación previa de los soportes y los agentes enlazantes utilizados (Zaborsky, 1973; Mosbach, 1987). En la tabla 1.7 se recogen algunos de los métodos más habituales de inmovilización por enlace covalente, así como algunos de los soportes más habituales que se utilizan.

Grupo funcional del soporte	Ejemplos de soporte	Agente acoplador	Grupo reactivo de la proteína
Hidroxilo	Dextranos, celulosas	Bromuro de cianógeno	Amino
Carboxilo	Poliacrilamidas	Carbodiimidas	Amino
Amino	Cerámicas modificadas	Glutaraldehído Nitrito sódico	Amino
Aldehido	Aldehidos poliméricos	Reacción directa	Amino y otros
Imidoésteres	Derivados de nilón	Reacción directa	Amino
Tiol	Polisacáridos modificados	Reacción directa	Cis-tiol

Tabla 1.7: Algunos métodos comunes de formación de enlace covalente entre enzima y soporte.

Uno de los problemas más importantes que presenta este tipo de protocolo es que las pérdidas de actividad suelen ser mayores que en el caso de la adsorción, debido a que se producen modificaciones químicas en algún aminoácido de la enzima.

Este sistema de inmovilización es muy habitual para distintos tipos de enzimas implicando normalmente pérdidas de actividad pero mejoras en la estabilidad frente a factores como pH y temperatura (Chellapandian, 1998; Spagna *et al.*, 1998), aunque su aplicación en lipasas ha sido mucho más reducida (Moreno *et al.*, 1997).

"Crosslinking"

Mediante la formación de enlaces cruzados entre enzimas, se forman agregados insolubles mediante un agente multifuncional que se enlaza **covalentemente** a la enzima. Normalmente los agentes usados son los mismos que para la inmovilización por enlace covalente. Este método es de uso más restringido y suele tener una aplicación analítica en el desarrollo de biosensores (Guerrieri *et al.*, 1998).

Inclusión

Este método se basa en la formación de una matriz tridimensional en presencia del **biocatalizador**, que queda atrapado dentro de su estructura. La matriz ha de permitir la retención de la enzima al mismo tiempo que la difusión de sustratos y productos y las más utilizadas son polímeros sintéticos o geles de origen natural.

Este sistema ha sido ampliamente utilizado para la inmovilización de células, y su aplicación para enzimas es bastante reducida debido a un aumento importante de los problemas de difusión y que la retención de la enzima es muy pobre. No obstante, se ha aplicado en la construcción de electrodos **enzimáticos**, por ejemplo, glucosa oxidasa y hexokinasa para la determinación de ATP (Compagnone y Guilbault, 1997), alcohol deshidrogenasa para la determinación de etanol (Cai *et al.*, 1997) o diamina oxidasa para la determinación de diamina (Bouvrette *et al.*, 1997).

1.5.3.3. Selección de la técnica de inmovilización

En la tabla 1.8 se recogen algunas de las principales características que definen los métodos de inmovilización existentes para enzimas, sin embargo, la elección siempre vendrá marcada por la enzima particular y sus características particulares en cada caso (Zaborsky, 1973; Mosbach, 1987).

Característica	Adsorción física	Enlace iónico	Enlace covalente	“Crosslinking”	Inclusión
Preparación	Fácil	Fácil	Difícil	Difícil	Difícil
Actividad enzimática	Baja	Alta	Alta	Moderada	Alta
Especificidad de sustrato	No modificable	No modificable	Modificable	Modificable	No modificable
Fuerza de enlace	Débil	Moderada	Fuerte	Fuerte	Fuerte
Regeneración	Posible	Posible	Imposible	Imposible	Imposible
Aplicabilidad	Baja	Moderada	Moderada	Baja	Alta
Coste	Bajo	Bajo	Alto	Moderado	Bajo

Tabla 1.8: Comparación entre métodos de inmovilización de enzimas.

1.6. Bioreactores enzimáticos

1.6.1. Reactores ideales. Distribución de tiempo de residencia (DTR)

En el estudio de los modelos de flujo que describen el comportamiento de los reactores, se hace referencia a dos modelos ideales, el de flujo pistón y el de tanque agitado o de mezcla perfecta, que representan los dos extremos en el diseño y funcionamiento de un reactor (Levenspiel, 1979). La ventaja de utilizar estos sistemas es su simplicidad y en que uno de los dos origina normalmente el funcionamiento óptimo. No obstante, la mayoría de reactores reales tienen un comportamiento intermedio entre estos dos extremos. En los reactores reales muchas veces aparecen zonas muertas, canales preferenciales, retromezcla y otras distorsiones del modelo de flujo ideal.

En el caso de los reactores reales, la distribución de tiempo de residencia (DTR) del material a través del reactor es el factor que determinará en que punto entre los dos comportamientos ideales se sitúa el flujo de un bioreactor. La técnica utilizada para determinar el modelo de flujo de un reactor es la denominada estímulo-respuesta, basada en la inyección de un trazador inerte y siguiendo la respuesta del sistema analizando la evolución de la concentración del trazador a la salida.

La elección del trazador es de vital importancia para obtener una información precisa acerca del comportamiento del fluido dentro del bioreactor. Los requisitos que debe cumplir el trazador son los siguientes:

- Miscible y de propiedades similares a las del fluido que se está investigando.
- Inerte, sin interaccionar con el biocatalizador ni con los sustratos y productos de la reacción.
- Fácilmente analizable, y detectable en concentraciones bajas.
- En sistemas multifásicos (por ejemplo, enzimas inmovilizados), no ha de ser transportado entre fases.

La introducción del trazador en el alimento al reactor puede seguir diversas estrategias, siendo los más habituales los de pulso y escalón. En la técnica de pulso, se introduce de forma instantánea una cantidad M del trazador a la corriente de alimento que entra en el reactor, y su concentración de salida se registra a lo largo del tiempo. En la fig. 1.9 se presenta un ejemplo de esta técnica.

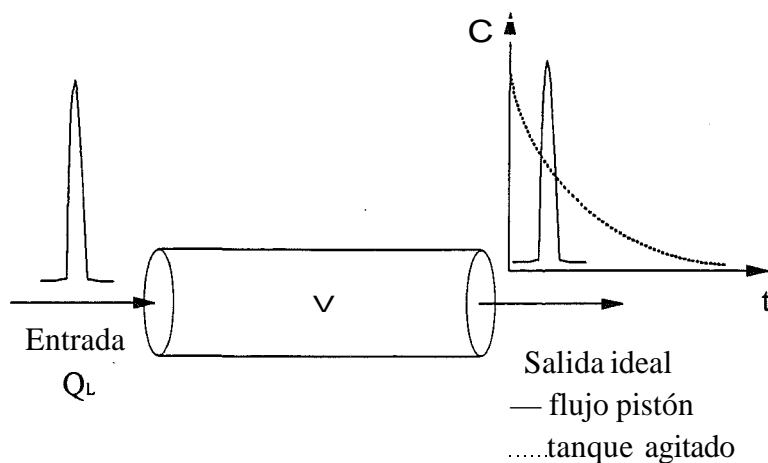


Fig. 1.9.: Respuesta de sistemas ideales para un pulso de trazador.

A partir de la curva se puede calcular el tiempo de residencia real del reactor que viene dado por la ecuación (1):

$$T = \frac{\int_0^t t C dt}{\int_0^t C dt} \quad (1)$$

y compararlo con el tiempo de residencia ideal que vendrá dado por:

$$T = \frac{V}{Q_L} \quad (2)$$

Además, el cálculo de la integral de la concentración de trazador con respecto al tiempo ha de resultar la cantidad total de trazador introducida en el sistema, que por otro lado se conoce. Este será el test de consistencia del experimento.

Muchas veces la curva C frente a t se representa de forma adimensional como una curva de E vs θ en la que E representa la concentración adimensional calculada como $V \cdot C / M$ y donde θ es el tiempo adimensional calculado como t / τ .

En el caso de que el trazador se introduzca en forma de escalón, con un caudal m , la variación de la concentración a la salida del bioreactor será de la forma que indica la fig. 1.10.

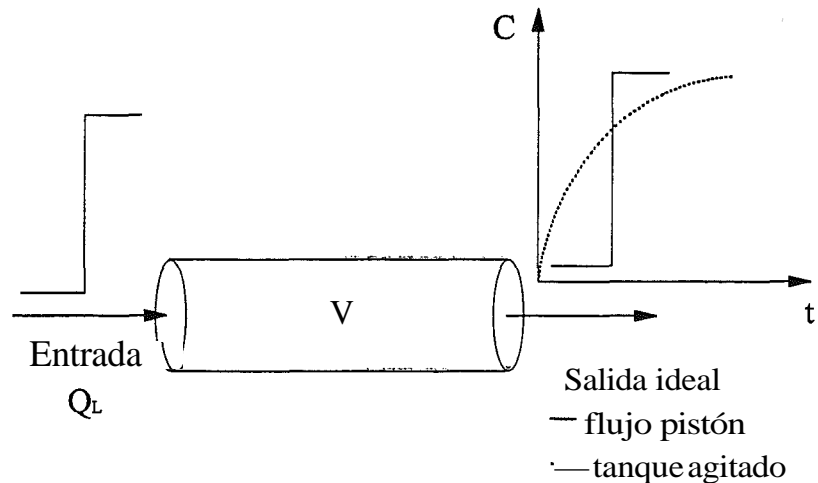


Fig. 1.10: Respuesta de sistemas ideales para un escalón de trazador.

En este caso, de la aplicación del balance de materia para el sistema se deduce el test de consistencia, que viene dado por la ecuación (3):

$$C_{max} \bar{t} = mV / Q_L^2 \quad (3)$$

La curva normalizada para los experimentos en escalón se conoce como curva F que se calcula como $Q_L \cdot C / m$, mientras que el tiempo de residencia real se calcula según la ecuación (4):

$$\bar{t} = \frac{\int_0^{C_{\text{max}}} t dC}{\int_0^{C_{\text{max}}} dC} \quad (4)$$

Las funciones E y F están relacionadas entre sí, ya que la primera es la derivada de la segunda, y la segunda la integral de la primera. Por tanto, independientemente de como se haga la introducción del trazador, el tratamiento posterior de los datos puede hacerse de ambas formas. Una vez obtenida la distribución de tiempo de residencia se puede pasar a estudiar cual es el tipo de flujo en el reactor.

1.6.2. Modelos de flujo

Una vez conocidos los datos de distribución de tiempo de residencia para un sistema determinado, las características de flujo han de ser evaluadas cuantitativamente mediante el uso de ajuste de modelos matemáticos. Los modelos de flujo no ideal pueden dividirse en tres grupos:

- **Modelos de dispersión:** correspondientes a pequeñas variaciones del modelo de flujo en pistón.
- **Modelos de recirculación:** correspondientes a pequeñas variaciones del modelo de mezcla completa.
- **Modelos compartimentados:** para el resto de situaciones intermedias.

1.6.2.1. Modelo de dispersión axial

Consiste en una variación del modelo de flujo en pistón ideal, en el que se considera un proceso de dispersión axial al mismo tiempo que el flujo convectivo. La introducción de este término origina que la concentración adimensional en función del tiempo viene dada por la ecuación (5):

$$C_{\theta} = \frac{1}{\sqrt{4\pi/Pe}} \exp\left[\frac{-Pe(1-\theta)^2}{4}\right] \quad (5)$$

donde Pe es el número de Peclet que se define como:

$$Pe' = \frac{uL}{D_z} \quad (6)$$

donde:

L es la longitud del reactor

u es la velocidad del fluido en el reactor

D_z es el coeficiente de dispersión axial.

y expresa el grado de mezcla del reactor, es decir, un $Pe = 0$ significa un sistema de tanque agitado perfecto, mientras que $Pe = \infty$ indica un flujo pistón ideal.

Para variaciones pequeñas del flujo pistón, las curvas que predice el modelo son simétricas, mientras que para desviaciones más considerables la forma de la curva no es simétrica, y esto ocurre para valores inferiores de 100 del número de Peclet.

1.6.2.2. Modelo tanques en serie

El reactor se representa por una serie de tanques perfectamente agitados y del mismo volumen, conectados en serie. El grado de mezcla del reactor global viene dado por el número de tanques N. Así, cuanto más elevado es el número de tanques, el reactor se acerca más a un flujo pistón. En este caso, a partir del balance de materia se puede deducir la expresión para la curva E que se presenta en la ecuación (7):

$$E(\theta) = \frac{N(N\theta)^{N-1}}{(N-1)!} \exp(-N\theta) \quad (7)$$

Con esta ecuación se puede generar una familia de curvas dando distintos valores a N.

1.6.2.3. Modelos compartimentados

Los modelos anteriores basados en desviaciones de un modelo ideal no son capaces de explicar todas las desviaciones respecto al flujo ideal. Para describir los reactores que presentan regiones poco agitadas, canalización o recirculación importante de fluido entre otras

posibles disfunciones se necesitan modelos **multiparamétricos**, en los cuales el volumen del reactor se divide en tres diferentes fracciones:

- región de flujo pistón
- región de flujo agitado
- zonas muertas

mientras que el flujo en su interior se compone de:

- flujo activo
- flujo de by-pass
- flujo de recirculación

Comparando la curva real de DTR y las curvas teóricas para diferentes combinaciones de compartimentos y flujos, se puede determinar que modelo se ajusta mejor al reactor real. Levenspiel (1979) realiza una descripción detallada de algunos de los modelos **compartimentados** típicos que describen algunas situaciones reales.

1.6.3. Tipos de bioreactores enzimáticos

Cuando se utilizan biocatalizadores inmovilizados, existen dos posibles configuraciones de reactor de acuerdo con la movilidad de las partículas de catalizador: partículas en movimiento o fijas. Los sistemas en que las partículas no están fijas son básicamente tres:

- reactor de tanque agitado
- reactor de lecho **fluidizado**
- reactor "air-lift"

mientras que los sistemas con partículas fijas se conocen como reactores de lecho fijo (Brink *et al*, 1988) e incluyen los reactores de membranas.

El reactor de **tanque agitado** es el más simple de diseño y uno de los más utilizados, aunque su uso no es recomendable para enzimas inmovilizadas debido a la poca resistencia de las partículas al esfuerzo cortante de las palas del agitador, o en casos donde exista inhibición

por producto, ya que trabaja a las condiciones de salida. No obstante, existen algunos trabajos utilizando enzimas libres (Margot *et al.*, 1998).

El reactor de **lecho fluidizado** se caracteriza por que las partículas del biocatalizador se mantienen en suspensión en el reactor mediante el caudal de alimentación, la recirculación del líquido o el gas producido y/o aportado al sistema. En este caso se necesitan partículas de tamaño pequeño y de densidad cercana a la del medio para favorecer la **fluidización**, con lo que se favorece la transferencia de materia entre el medio y el biocatalizador. Sin embargo, su principal desventaja es el mantenimiento de la fluidización que depende fuertemente de la densidad de las partículas. Este sistema es poco empleado en enzimas aunque existe alguna aplicación con lipasas (Fishman y Zviely, 1998).

Un caso particular de reactor fluidizado es el de las **columnas de burbujeo** en que las partículas de biocatalizador están dispersas en la fase fluida por efecto de la ascensión de las burbujas de un gas, o por efecto conjunto del flujo de gas y líquido.

En el reactor **air-lift** se distinguen dos zonas diferenciadas, de las cuales sólo una es alimentada con un gas. La diferencia de composición en la zona aireada y la no aireada provoca una diferencia de densidad que provoca la circulación del fluido. De nuevo, la ventaja de este tipo de reactores son los elevados coeficientes de transferencia conseguidos. Existen algunos ejemplos de este tipo de reactor como son la producción de ácido glucónico con glucosa oxidasa (Nakao *et al.*, 1997).

El sistema más utilizado para enzimas es el reactor de **lecho fijo**. Este es el modelo de bioreactor más ligado al uso de enzimas inmovilizados. Este es el modelo más simple de construcción y operación en el que la solución de sustrato que se alimenta al reactor circula en una dirección determinada y simultáneamente va teniendo lugar su conversión, por tanto, será adecuado en el caso de inhibición por producto pero no en casos de inhibición por sustrato. El modelo que sigue este reactor en el caso ideal es el de flujo pistón. La limitación más importante de este tipo de reactor es la pérdida de carga que se produce por el paso del fluido a través del lecho, así como la difusión en el interior de las partículas. Estos dos factores serán los que determinen el tamaño de la partícula seleccionado, ya que partículas

muy grandes provocan poca pérdida de carga pero tienen limitaciones **difusionales** importantes mientras que con el uso de partículas pequeñas se favorece la difusión interna pero aumentan los problemas de pérdida de carga a través del lecho.

Este sistema está ampliamente utilizado para todo tipo de enzimas, normalmente en el caso de medios orgánicos con enzimas inmovilizados en distintos tipos de soportes, como acilasas (Bianchi *et al.*, 1997), enzimas pectolíticas (Dinella *et al.*, 1997), amilasas (Arica *et al.*, 1998), destacando su aplicación en sistemas de determinación analítica tipo FIA (Flow Injection Analysis) (Kiba *et al.*, 1997).

Un caso particular muy utilizado en reactores enzimáticos son los reactores con membranas, cuya configuración más habitual es la conocida como fibras huecas (hollow fibers). Estos reactores operan como flujos en pistón en los cuales la enzima está inmovilizada en el espacio libre entre las fibras, el substrato difunde a través de la membrana, reacciona con la enzima y el producto se devuelve por difusión a la zona de suspensión homogénea (Fig. 1.11).

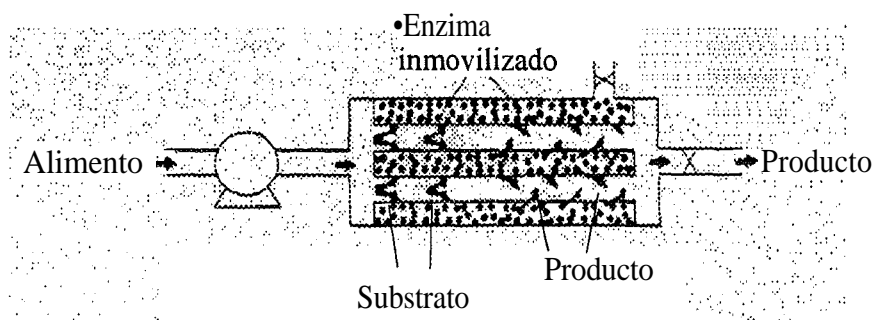


Fig. 1.11.: Esquema de un reactor de fibras huecas.

Este sistema está muy implementado en todo tipo de enzimas como amilasas (Lopez-Ulibarri y Hall, 1997), aunque ha sido empleado con éxito junto a reactores de membrana en general fundamentalmente utilizando lipasas debido a la capacidad de éstas de inmovilizarse en superficies (Prazeres *et al.*, 1993; Matsumae *et al.*, 1994).

1.6.4. Procesos industriales enzimáticos

Godfrey y West (1996) recogen aquellos procesos donde las enzimas se emplean en procesos a escala industrial. En la tabla 1.9 se recogen algunos de estos procesos.

Proceso	Enzima(s)	Inmovilización	Bioreactor utilizado
Fermentación alcohólica	α -amilasa glucoamilasa	Enzima libre	tanque agitado
Enzimas analíticos (biosensores)	Varios	Inclusión Crosslinking	-
Enzimas analíticos (diagnosis)	Varios	Enzima libre	-
Producción de pasta	Amilasas Carbohidrasas Proteinasas y lipasas	Enzima libre	tanque agitado
Producción de cerveza	Proteasas α -amilasa	Enzima libre	tanque agitado
Producción de queso	Lipasas Lisozima	Enzima libre	-
Producción de fructosa	Xilosa isomerasa	Enzima libre	tanque agitado
Modificación de aceites y grasas	Lipasas	Adsorción	lecho fijo
Producción de aspartamo	Termolisina	Enzima libre	tanque agitado
Producción de esteres que dan sabores	Lipasas	Adsorción	tanque agitado lecho fluidizado lecho fijo
Producción de emulsificantes	Lipasas	Enzima libre	tanque agitado
Productos farmacéuticos	Lipasas Proteasas Acilasas Aminotransferasas	Adsorción Enlace covalente Crosslinking	tanque agitado lecho fijo
Detergentes	Proteasas Lipasas Amilasas Celulasas	Enzima libre	-
Tratamiento de residuos	Varios	Enzima libre	tanque agitado
Producción de zumos	Varios	Enzima libre	tanque agitado
Producción de aminoácidos	Acilasas	Enzima libre	reactor de membrana
Producción de bloqueantes quirales	Lipasas	Inclusión	reactor de membrana
Producción de pieles	Proteasas	Enzima libre	-
Extracción de aceite	Fosfolipasas	Enzima libre	tanque agitado

Producción de papel	Celulasas	Enzima libre	tanque agitado
Hidrólisis de almidón	Amilasas	Enzima libre	tanque agitado
Industria textil	Amilasas	Enzima libre	-
Producción de vino	Pectinasas	Enzima libre	-
Enriquecer alimento de animales	Varios	Enzima libre	-

Tabla 1.9.: Algunos procesos enzimáticos industriales.

1.7. Utilización de lipasas

1.7.1. Inmovilización de lipasas

Las lipasas se han **inmovilizado** a lo largo de los últimos años en un gran número de soportes y utilizando un gran número de métodos. Entre ellos, se han desarrollado métodos de adsorción, inclusión, enlace covalente utilizando prácticamente todo tipo de soportes, **hidrofilicos, hidrofóbicos** de todo tipo de procedencia. En la tabla 1.10 se recogen a modo de resumen algunas de las aplicaciones más representativas en las que se han empleado lipasas inmovilizadas, recogándose también la técnica empleada de inmovilización y el soporte utilizado.

La mayoría de los trabajos utilizan la técnica de adsorción sobre distintos soportes, aunque también se encuentran presenten los métodos de enlace covalente y en menor medida los de inclusión y crosslinking. El gran desarrollo de las lipasas como biocatalizadores **enantioselectivos** así como su buen comportamiento en medios orgánicos (Cambou y Klivanov, 1984) originan que la inmovilización sea un factor a tener en cuenta en cualquier reacción que implique el uso de lipasas. Sin embargo, la potencialidad fundamental de la inmovilización que es la posible reutilización de la enzima rara vez es estudiada (Vázquez-Lima *et al.*, 1995).

Como factores importantes que pueden destacarse en la inmovilización cabe destacar los siguientes (Tabla 1.10):

- El método usado por excelencia es el de **adsorción** sobre soportes de naturaleza muy diversa, siendo posibles los soportes hidrofóbicos y hidrofílicos.
- La técnica de inmovilización por adsorción que es normalmente muy sencilla implica poner en contacto una solución de la lipasa que se quiere inmovilizar con el soporte y dejar un tiempo de contacto (que suele variar entre 1 y 24 horas) en las condiciones adecuadas (suelen ser ligera agitación y baja temperatura a un pH cercano al óptimo) hasta alcanzar el equilibrio de adsorción que suele venir descrito por una ley de tipo Langmuir (Gittlensen *et al.*, 1997). Tras esto se separa el medio por filtración o **liofiltración**. En el

primer caso se suele lavar el soporte con agua destilada o tampón mientras que en el segundo caso se produce una deposición de la lipasa sobre el soporte.

- Los métodos de inmovilización por enlace covalente son posibles pero se emplean en menor medida, así como los de inclusión o “crosslinking”. Estos métodos incluyen un **pretratamiento** del soporte y suelen provocar pérdidas o cambios importantes en la actividad **enzimática**.
- La inmovilización de lipasas suele suponer una mejora en la **estabilidad** de la enzima, aunque también puede cambiar propiedades como los óptimos de temperatura y pH y en algunos casos parece tener influencia sobre la **enantioselectividad**.
- Aunque en la mayoría de trabajos no se ha estudiado el efecto de la **reutilización** de lipasas inmovilizadas, en general, se puede concluir que las lipasas pueden reutilizarse sin tratamientos muy complejos, normalmente tan simples como una operación de lavado y secado.
- Las lipasas inmovilizadas con distintos métodos pueden ser utilizadas en una gran variedad de **reacciones**, tanto de hidrólisis como de síntesis, así como en todo tipo de medios, acuosos, orgánicos o bifásicos.
- Las técnicas de inmovilización se han aplicado a lipasas provenientes de una gran variedad de **microorganismos**, e incluso a lipasas obtenidas a partir de mamíferos.
- Entre todas las lipasas estudiadas que se han inmovilizado, destacan por número de aplicaciones las siguientes:
 - a) *Candida rugosa*: se compra de forma libre y se inmoviliza en distintos soportes.
 - b) *Mucor miehei*: en concreto Lipozyme® distribuido por Novo Nordisk, que es una lipasa ya inmovilizada en Duolite A568.
 - c) *Candida antártica*: lipasa B comercializada por Novo Nordisk con el nombre de Novozyme® 435, que ya viene inmovilizada en una resina acrílica.
 - d) Otras lipasas que se usan inmovilizadas en menor proporción: *Pseudomonas sp.* (Fishman y Zviely, 1998), *Rhizopus niveus* (De Castro y Gago, 1998) y *Penicillium roquefortii* (Fureby *et al.*, 1997).

Autor	Lipido	Soporte	Técnica	Modificación	Cambio en	Realización
Y <i>et al.</i> (1982)	Lipidos de <i>Candida rugosa</i>	Olefinas de agarose y fenil-sefarcis	Adsorción	Hidrólisis de glicéridos	No describe	Sí
Lavayre y <i>et al.</i> (1982)	<i>Candida rugosa</i>	Vidrio poroso	Adsorción	Síntesis de éster	Activa	No
Marlot <i>et al.</i> (1985)	<i>Candida rugosa</i>	Vidrio poroso Celita Alumina Polipirearol	Adsorción Adsorción Adsorción Adsorción Incausión	Síntesis de éster	Activa	No
Taylor <i>et al.</i> (1986)	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Membrenas de nylon	Adsorción	Hidrólisis de sebo	No describe	No
Wisdom <i>et al.</i> (1987)	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Tierras diatomeas	Adsorción	Interesterificación de grasas	Activa	No
Cillero <i>et al.</i> (1987)	<i>Candida rugosa</i>	Sílica gel	Adsorción	Síntesis de éster	No describe	No
Goderis <i>et al.</i> (1987)	<i>Rhizopus</i>	Celita	Adsorción	Interesterificación	Efectividad	No
H <i>et al.</i> (1988)	<i>Candida rugosa</i>	Fibras húctas	Adsorción	Hidrólisis de lípidos	No describe	No
Nori <i>et al.</i> (1988)	<i>Candida rugosa</i>	Vidrio poroso	Adsorción	Síntesis de éster	Activa	Sí
Battistel <i>et al.</i> (1991)	<i>Candida rugosa</i>	Duolite Amberlite	Adsorción	Hidrólisis quiral	Efectiva	No
Yang y Rh <i>et al.</i> (1991)	<i>Candida rugosa</i>	Amberlite	Adsorción	Hidrólisis de lípidos	No describe	No
Gelek <i>et al.</i> (1992)	<i>Candida rugosa</i>	Celulosa	Adsorción	Hidrólisis	Activa	No
Charton y Mac (1993)	<i>Geotrichum candidum</i>	EP100	Adsorción	Hidrólisis y síntesis de esteres	No describe	No
M <i>et al.</i> (1993)	<i>Candida rugosa</i>	EP100	Adsorción	Hidrólisis	Actividad y estabilidad	Sí
Gandhi <i>et al.</i> (1995)	<i>Mucor miehei</i>	Duolite	Adsorción	Síntesis de éster	Efectiva	No
M <i>et al.</i> (1995)	<i>Candida rugosa</i>	Agarosa Sílica Alumina	Adsorción Adsorción Adsorción	Hidrólisis quiral	Efectividad	No

Ferreira-Dias y da Fonseca (1995)	<i>Candida rugosa</i>	Poliuretano	Crosslinking	Hidrólisis de aceite	Estabilidad	No				No
Basri et al. (1996)	<i>Candida rugosa</i>	Celita Polímeros	Adsorción	Síntesis de ésteres	Actividad	No				No
Balcao et al. (1996a)	<i>Aspergillus niger</i> <i>Candida rugosa</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Humicola lanuginosa</i> <i>Mucor javanicus</i> <i>Penicillium camembertii</i> <i>Penicillium roquefortii</i> <i>Rhizopus delemar</i> <i>Rhizopus oryzae</i> <i>Geotrichum candidum</i>	Fibras huecas	Adsorción	No descrito	No descrito	No				No
Sánchez et al. (1996)	<i>Candida rugosa</i>	Agarosa Silica gel EP100	Covalente Covalente	Hidrólisis enantioselectiva	Enantioselectividad	No				No
Gitlesen et al. (1997)	<i>Aspergillus niger</i> <i>Candida rugosa</i> <i>Pseudomonas fluores.</i> <i>Humicola lanuginosa</i> <i>Penicillium cycloptami</i> <i>Penicillium roquefortii</i> <i>Rhizopus delemar</i> <i>Rhizopus niveus</i> <i>Rhizopus jaconicus</i>		Adsorción	No descrito	No descrito	No				No
Murray et al. (1997)	<i>Candida rugosa</i>	Poliestireno EP400	Adsorción	Hidrólisis de aceite	Estabilidad Actividad	Sí				Sí
Maugard et al. (1997)	<i>Candida antártica</i>	Resina acrílica	Adsorción	Síntesis de surfactantes	No descrito	No				No
Danieli et al. (1997)	<i>Candida antártica</i>	Resina acrílica	Adsorción	Síntesis enantioselectiva	No descrito	No				No
Van den Heuvel et al. (1997)	<i>Pseudomonas</i> sp. y otras especies	HSC	Adsorción	Síntesis enantioselectiva	Actividad	No				No

Selmi et al. (1997)	<i>Mucor miehei</i>	Duolite	Adsorción	Síntesis de esteres	No descrito	No
Fureby et al. (1997)	<i>Penicillium roquefortii</i>	EP100	Adsorción	Alcoholisis	No descrito	No
Bagi et al. (1997)	Páncreas de cerdo	Poliacrilamida Celita Glutaraldehído	Covalente Adsorción Crosslinking	Hidrólisis	Estabilidad	No
Chen y Wang (1997b)	<i>Rhizopus niveous</i>	Células sobre celulosa	Inclusión	Síntesis de esteres de ceras	No descrito	No
Bouwer et al. (1997)	<i>Rhizopus javanicus</i>	Fibras huecas	Adsorción	Hidrólisis de grasas	No descrito	No
Moreno et al. (1997)	<i>Candida rugosa</i>	Agarosa Silica gel	Covalente Covalente	Hidrólisis de esteres	Estabilidad	No
Navia y Clair (1997)	No descrito	Cristales	Crosslinking	Biosensores	No descrito	No
De Castro y Gago (1998)	<i>Candida antártica</i> <i>Mucor miehei</i>	Resina acrílica Duolite	Adsorción	Síntesis de amidas quirales	No descrito	No
Bourg-Garros et al. (1998)	<i>Candida antártica</i> <i>Mucor miehei</i>	Resina acrílica Duolite	Adsorción	Síntesis de acetatos	No descrito	No
Lee y Swaisgood (1998)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Vidrio poroso	Adsorción	Hidrólisis de grasas	Estabilidad	No
Knezevic et al. (1998)	<i>Candida rugosa</i>	Zeolite	Adsorción	Hidrólisis de aceites	Actividad	Sí

Tabla 1.10: Resumen de trabajos con lipasas inmovilizadas.

1.7.2. Cinéticas **enzimáticas** para lipasas

En general, las cinéticas descritas para lipasas son muy variadas y dependerán básicamente de tres factores:

- del tipo de reacción que se esté estudiando.
- del medio de reacción: acuoso, orgánico o bifásico.
- de si la lipasa se encuentra inmovilizada o no.

El mecanismo natural de las lipasas cuando trabajan en forma soluble **hidrolizando** substratos insolubles (actividad lipolítica) no se corresponde habitualmente con una cinética de tipo **Michaelis-Menten** (Verger *et al.*, 1990), debido a que el mecanismo de reacción normalmente incluye una primera etapa de adsorción sobre la **superficie** del sustrato, etapa que muchas veces puede ser limitante (Marangoni, 1994) y que normalmente es la que se intenta mejorar por distintos métodos (Kim *et al.*, 1984; Kim y Chung, 1989). Otro factor que tendrán que tener en cuenta los modelos cinéticos detallados es la conocida activación interfacial que se produce en las lipasas al encontrar una interfase orgánico-acuosa y que se ha descrito como altamente variable en función del microorganismo y del sustrato (Jaeger *et al.*, 1994; Martinelle *et al.*, 1995).

Sin embargo, cuando los esteres que se **hidrolizan** son solubles (actividad esterásica) no existe dicha interfase y las lipasas suelen seguir cinéticas de tipo Michaelis-Menten (Redondo *et al.*, 1995).

No obstante, hay que señalar que en muchas ocasiones, aunque no se siga una cinética simple, se adopta el uso de pseudocinéticas de tipo sencillo como primer orden o la propia de Michaelis-Menten como simplificación de cinéticas mucho más complejas, originándose en este caso lo que se conocen como constantes aparentes (Gargouri *et al.*, 1991; Arroyo *et al.*, 1996).

Cuando se trabaja con lipasas inmovilizadas, las diferencias que pueden aparecer con respecto a la enzima libre son muy importantes, obteniéndose constantes cinéticas que pueden

diferir en órdenes de magnitud para enzimas libres e inmovilizados sobre diferentes soportes o mediante distintas técnicas. Por ejemplo, Sánchez *et al.* (1996) obtienen para *Candida rugosa* cambios de hasta 20 veces en las constantes cinéticas cuando se inmovilizó covalentemente la enzima en silica y agarosa, aunque estos cambios eran notablemente diferentes en el caso de que se tratara de actividad esterásica o lipolítica. Al mismo tiempo, cuando las lipasas inmovilizadas se utilizaron para llevar a cabo reacciones quirales, las velocidades de reacción para cada enantiómero eran distintas.

Otros autores, sin embargo, han encontrado diferentes resultados para otros tipos de lipasas. Lieberman y Ollis (1975) utilizando métodos de inmovilización tipo “crosslinking” con lipasa pancreática señalan la obtención de los mismos parámetros cinéticos para la enzima libre e inmovilizada. Pencreac’h y Baratti (1997) con lipasas de *Pseudomonas cepacia* observan que la enzima libre o inmovilizada sobre polipropileno poroso obedecía a cinética de Michaelis-Menten pero con constantes variables según el tipo de sustrato con respecto a la lipasa libre.

Por lo que se refiere a lipasas libres e inmovilizadas trabajando en medio orgánico, recientemente se han publicado diversos trabajos proponiendo distintas cinéticas asociadas a diversos mecanismos de reacción, además de las clásicas pseudocinéticas descritas para medios acuosos. Entre ellas destacan:

- 1) **Botta *et al.*** (1997): realizan una aproximación a la cinética mediante el estudio tridimensional de las moléculas que participan en la reacción. Mediante las estructuras del centro activo determinadas experimentalmente, se deducen la **afinidad** de la lipasa de *Candida rugosa* hacia ciertos sustratos. Los autores sugieren una vía de simulación para realizar estos cálculos.
- 2) Otra aproximación para explicar valores cinéticos es la desarrollada por **Parve *et al.*** (1997) donde se interpretan los datos de velocidad inicial a partir de la teoría de localización de orbitales.
- 3) En muchos casos, donde aparecen **esterificaciones** en las que se produce **agua**, se correlaciona la cinética con el comportamiento que tiene el agua en el sistema y se señala

la actividad de agua como un factor determinante en la formulación y cálculo de la cinética (Selmi *et al.*, 1997).

- 4) Chen y Wang (1997b): proponen una cinética de tipo Ping-Pong Bi Bi basada en el mecanismo propuesto por Chulalaksananukul *et al.* (1990). Un esquema de una síntesis de un alcohol con un ácido graso para generar éster y agua se detalla en la Fig. 1.12.

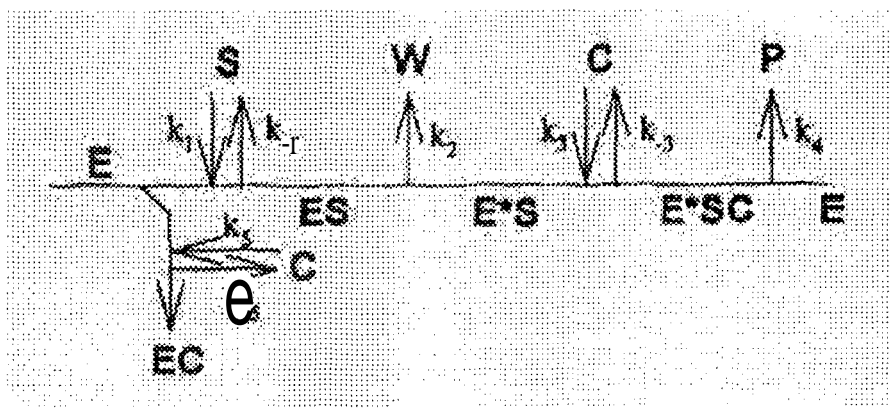


Fig. 1.12: Esquema del mecanismo de una reacción de esterificación según el modelo Ping-Pong Bi Bi descrito por Chen y Wang (1997b). E: enzima, S: ácido graso, W: agua, C: alcohol, P: éster, EC: complejo enzima-alcohol, ES: complejo enzima-ácido graso, E*S: complejo acil-enzima, E*SC: complejo intermediario.

- 5) Por último, señalar que en trabajos recientes se ha llegado a diferenciar distintos comportamientos cinéticos para isoenzimas A y B puros de lipasa de *Candida rugosa* (Plou *et al.*, 1997). En el trabajo se constata como para distintos sustratos las cinéticas podían ser diferentes para ambos isoenzimas. A modo de resumen:
- **Actividad lipásica** (tributirina): el valor de la constante específica aparente de Michaelis-Menten es el doble para la lipasa A.
 - **Actividad esterásica** (*p*-nitrofenil acetato): comportamiento cinético muy similar para ambas isoenzimas. Se sigue una cinética de tipo Michaelis-Menten.
 - **Enantioselectividad** (2-cloro-metil-propionato): ninguna de las isoenzimas sigue una cinética de Michaelis-Menten sino de tipo sigmoidal. Al mismo tiempo, se observan ligeras diferencias en la enantioselectividad.

1.7.3. Bioreactores con lipasas

En general, se puede considerar que el sistema más económicamente favorable para trabajar con lipasas en un bioreactor es el de utilizarlas inmovilizadas. Esto es debido normalmente al aumento de estabilidad que normalmente lleva asociado el proceso de inmovilización y que en sistemas en continuo es el factor determinante de la viabilidad del proceso.

Los cinco tipos de bioreactores que más comúnmente se han empleado con lipasas inmovilizadas son:

- reactor discontinuo de tanque agitado
- reactor de lecho fijo o empacado
- reactor continuo de tanque agitado
- reactor de lecho fluidizado
- reactor de membrana

En el trabajo de Balcao *et al.* (1996b) se recogen con detalle muchos de los trabajos en los que se han desarrollado reactores con lipasas inmovilizadas.

Los reactores **discontinuos de tanque agitado** son los más utilizados, caracterizándose por un sistema de operación sencillo así como una recuperación simple por filtración o centrifugación de la enzima. Sin embargo, el problema de operar en discontinuo genera la aparición de tiempos de carga y descarga que limitan en ciertos procesos su aplicación a gran escala. En esterificaciones en medio orgánico, donde se produce agua que puede ser causante de un descenso en el rendimiento del reactor, normalmente este sistema tendrá que llevar acoplado un sistema efectivo de eliminación del agua de los que el más habitual es la adición de sales o de tamiz molecular (Vázquez-Lima *et al.*, 1995; Han y Rhee, 1998). En este sistema se han desarrollado la mayoría de reacciones descritas con lipasas tanto libres como inmovilizadas (Balcao *et al.*, 1996b).

Los **reactores de lecho fijo** constituyen una buena alternativa debido a su alta **eficacia**, facilidad de **construcción** y forma de operar (como reactor de flujo pistón) y han sido utilizados tradicionalmente en operaciones a escala industrial. En este caso también suele ser necesario algún sistema de control de agua en reacciones de **esterificación** (Rosell *et al.*, 1996). Normalmente, los problemas asociados a este tipo de reactor son la pérdida de carga a través del reactor y la posible limitación de la difusión. Esta configuración de reactor se ha empleado en reacciones en medio orgánico incluyendo síntesis de esteres, **interesterificación**, **transesterificación**, alcoholólisis y en algunas casos para hidrólisis de aceites cuando la inmovilización era de tipo covalente (Balcao *et al.*, 1996b) y en algunas resoluciones de mezclas racémicas (Battistel *et al.*, 1991).

Por lo que se refiere al **reactor continuo de tanque agitado**, su uso es bastante limitado a pesar de su bajo coste debido a que normalmente requiere mayor volumen de reacción para las cinéticas que describen el comportamiento de las lipasas. Otro impedimento importante que presenta es el efecto negativo que suele tener la agitación mecánica sobre el soporte de inmovilización y sobre la propia enzima (Lee y Choo, 1989). Esta configuración se ha empleado en algunas reacciones de hidrólisis, acidólisis y síntesis de esteres (Balcao *et al.*, 1996b).

El reactor de **lecho fluidizado** se presenta como un intermedio entre los dos tipos anteriores y es una opción para eliminar restricciones difusionales. Sin embargo, su complejidad de operación ha limitado su uso con Hpasas a algunas reacciones de esterificación (Balcao *et al.*, 1996b).

Los reactores de **membrana** han sido ampliamente utilizados con Hpasas. En estos reactores, la lipasa se inmoviliza en una membrana, que puede ser en forma de superficie o en forma de fibra hueca. Estos reactores son muy indicados en sistemas bifásicos y su principal problema operacional es el de la polarización de la membrana. Un resumen de las posibles configuraciones se recoge en el trabajo de Prazeres y Cabral (1994). Los tipos de membranas que se han utilizado son muy variables, hidrofílicas e hidrofóbicas, aunque en trabajos recientes se señalan las hidrofílicas como las mejores en términos de productividad (Bouwer *et al.*, 1997).

Algunas de las reacciones en las que se han aplicado con éxito lipasas inmovilizadas en reactores de membrana se detallan en la tabla 1.11.

Autor	Lipasa	Reacción	Tipo de membrana	Configuración
Hoq <i>et al.</i> (1984)	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Síntesis de glicéridos	Microporosa de polipropileno (Hidrofóbica)	Superficie
Hoq <i>et al.</i> (1985)	<i>Candida rugosa</i>	Hidrólisis de aceite de oliva	Microporosa de polipropileno (Hidrofóbica)	Fibra hueca
Yamané <i>et al.</i> (1986)	<i>Pseudomonas flúor escens</i>	Glicerólisis de grasas	Microporosa de polipropileno (Hidrofóbica)	Superficie
Taylor <i>et al.</i> (1986)	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Hidrólisis de grasas	Microporosa de nilón (Hidrofóbica)	Superficie
Pronk <i>et al.</i> (1988)	<i>Candida rugosa</i>	Hidrólisis de triglicéridos	Celulosa (Hidrofilica)	Fibra hueca
Malcata <i>et al.</i> (1992)	<i>Aspergillus niger</i>	Hidrólisis de aceite	Microporosa de polipropileno (Hidrofóbica)	Fibra hueca

1.7.4. Formas de expresar y calcular la enantioselectividad

Desde el inicio del desarrollo de reacciones cuyo objetivo era resolver una mezcla racémica, ha existido la necesidad de **cuantificar** el progreso o la calidad del producto obtenido. La referencia clásica es la proporcionada por Chen *et al.* (1982) donde se definen los siguientes conceptos:

Exceso **enantiomérico** (**EE**):

$$EE_r = \frac{C_r - C_s}{C_r + C_s} (x100) \quad EE_s = \frac{C_s - C_r}{C_r + C_s} (x100) \quad (8)$$

El exceso enantiomérico siempre se refiere a uno de los dos enantiómeros R o S, y puede referirse al producto o al reactivo (Ecuación (8)), viniendo el uso de uno u otro condicionado por la facilidad de análisis de productos o reactivos. El exceso enantiomérico tomará valores entre el 0 y el 100%.

Enantioselectividad o "enantiomeric ratio" (E):

$$E = \frac{\ln[(1-X)(1-EE)]}{\ln[(1-X)(1+EE)]} \quad (9)$$

Este valor relaciona la conversión total con el exceso enantiomérico para dar un valor entre 0 para reacción no enantioselectiva e infinito para una reacción completamente enantioselectiva. En términos generales, se considera una reacción enantioselectiva a partir de valores de E superiores a 25, aunque este valor depende fuertemente de la fuente consultada. La ventaja de usar este valor es que no depende de la conversión y, por tanto, no ha de variar a lo largo de la reacción, teniendo su origen en consideraciones cinéticas. También puede ser calculado a partir del EE del producto o del reactivo.

Conversión (X):

Este valor tiene el **significado** general de conversión, con lo que se puede calcular de distintas formas a partir de las concentraciones de productos o reactivos.

En el trabajo de Straathof y Jongejan (1997) se hace una recopilación de distintas formas de evaluar la enantioselectividad a partir del valor propuesto por Chen *et al.* (1982). En este trabajo se estudian métodos de cálculo de este parámetro y se discute la influencia que tienen factores como:

- Presencia de reacciones paralelas
- Cinética y termodinámica de la reacción principal
- Inhibición **enzimática**
- Concentración en exceso de enzima
- Homogeneidad de las fases
- Equilibrio químico
- Limitación por difusión
- Mezcla incompleta
- Tipo de reactor

Aunque los parámetros descritos por Chen *et al.* (1982) han sido ampliamente utilizados en todo tipo de resoluciones (Kazlauskas *et al.*, 1991; Chiou *et al.*, 1992; Santaniello *et al.*, 1993, Secundo *et al.*, 1997), algunos autores proponen otras formas de **cuantificar** la enantioselectividad; así, Straathof *et al.* (1995) proponen el uso de un balance quiral en el caso de que la resolución sea cinética,

Por otro lado, López-Belmonte *et al.* (1997) proponen un nuevo parámetro denominado factor enantiomérico (EF) que permite evaluar la enantioselectividad de forma sencilla. El factor enantiomérico se calcula como el cociente del exceso enantiomérico experimental (calculado según la ecuación (8)) y el denominado exceso enantiomérico teórico (ecuación (9)), que corresponde al valor que tendría el exceso enantiomérico si sólo reaccionara el enantiómero de velocidad de reacción más rápida. Así pues, un valor del factor enantiomérico de 1 significa enantioselectividad perfecta, mientras que un valor de 0 corresponde a ausencia de resolución.

$$EF = EE / EE_T \quad \text{con} \quad EE_T = \frac{X}{100 - X} (x100) \quad (10)$$

1.7.5. Resolución de ácidos 2-aril propiónicos con lipasas

1.7.5.1. Precedentes

Durante los últimos años, la resolución vía hidrólisis, síntesis y transesterificación, de productos finales o intermediarios de la industria en general y farmacéutica en particular se ha incrementado espectacularmente tanto en la investigación académica como en la industrial (Federsel, 1993; Margolin, 1993; Stinson, 1994).

Las principales razones que han motivado este cambio en el interés por este tipo de compuestos son:

- El **beneficio** médico de usar únicamente el compuesto ópticamente puro que tiene la actividad biológica. Hay numerosos ejemplos en los que el principio activo deseado se encuentra exclusivamente en uno de los enantiómeros. La presencia del otro enantiómero puede causar pérdida de potencia en el enantiómero de interés, inactivación e incluso actuar con efecto totalmente opuesto al deseado, pudiendo llegar a causar trastornos en el paciente (Arien, 1986).
- Cambios en la normativa de regulación del uso de este tipo de medicamentos. Las nuevas normativas promovidas por las autoridades correspondientes están favoreciendo fuertemente el desarrollo de productos farmacéuticos que contengan únicamente el enantiómero biológicamente activo y no la mezcla racémica, siendo prohibida, en un futuro no muy lejano, la presencia del racémico incluso en aquellos casos en que parezca ser inocuo la presencia del biológicamente no activo.
- Los grandes avances producidos en la síntesis de compuestos ópticamente puros. De manera que es posible la producción de grandes cantidades de enantiómeros mediante el uso de síntesis química asimétrica, cinética enzimática, cristalización enantioselectiva o cromatografía quiral. Entre estos métodos la aplicación de enzimas o microorganismos está aumentando considerablemente (Klibanov, 1990; Schoffers *et al.*, 1996).

De entre los muchos compuestos que actualmente se resuelven vía **enzimática** se va a centrar el estudio en la resolución de ácidos 2-aryl-propiónicos (profenos). En la tabla 1.12 se recogen los principales componentes de este grupo.

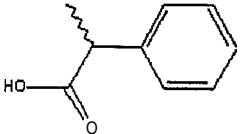
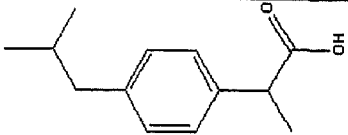
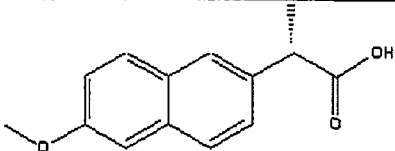
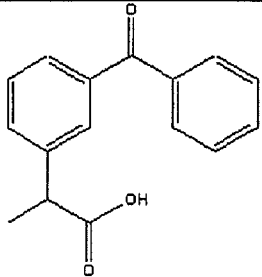
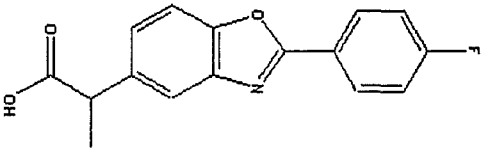
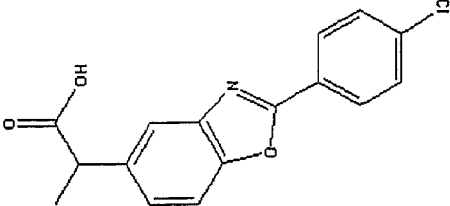
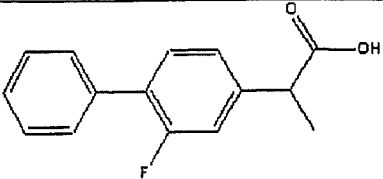
Compuesto	Fórmula	Estructura
Acido 2-fenil propiónico	$C_9H_{10}O_2$	
Ibuprofeno	$C_{13}H_{18}O_2$	
Naproxeno	$C_{14}H_{14}O_3$	
Ketoprofeno	$C_{16}H_{14}O_3$	
Flunoxaprofeno	$C_{16}H_{12}FNO_3$	
Benoxaprofeno	$C_{16}H_{12}ClNO_3$	
Flurbiprofeno	$C_{15}H_{13}FO_2$	

Tabla 1.12: Estructuras de algunos de ácidos 2-aryl propiónicos resueltos con lipasas.

Estos compuestos forman un importante grupo de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, conocidos bajo las siglas NSAIDs ("non-steroidal anti-inflammatory drugs"). Su actividad farmacológica reside principalmente en el (S)-enantiómero (Hutt y Caldwell, 1984). Por ejemplo, se ha demostrado que el (S)-ibuprofeno es 160 veces más activo que el (R) en la inhibición de la síntesis de la prostaglandina in vitro (Adams *et al.*, 1976). Ante estos resultados queda manifiesto el gran esfuerzo que se está produciendo para conseguir sintetizar el enantiómero de interés puro, a pesar de que a excepción del (S)-naproxeno y el (S)-flunoxaprofeno se están utilizando en los productos terapéuticos como mezcla racémica.

De entre toda esta familia de compuestos el estudio se centrará en el ácido 2-fenil propiónico, como el precursor de la familia, y el ibuprofeno. El ibuprofeno, como integrante de la familia NSAIDs, es un agente antiinflamatorio no esterooidal usado en el tratamiento de la artritis y otras enfermedades similares (Davies y Avery, 1971; Hamman *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1997). Por otro lado, la resolución de llevará a cabo mediante esterificación de estos ácidos con un alcohol lineal en medio orgánico.

1.7.5.2. Factores que afectan a este tipo de reacciones

Los principales factores que afectan a este tipo de reacciones de síntesis, en las que intervienen un ácido orgánico de naturaleza quiral y un alcohol en medio orgánico, se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. Naturaleza y fuente de la enzima (microbiana, extracción de órganos de animales, etc.).
2. Tipos de alcoholes y ácidos utilizados.
3. Relación ácido-alcohol empleada.
4. Concentración de la enzima.
5. Concentración de los substratos.
6. Factores físicos externos (temperatura, agitación, etc.).
7. Tipo de disolvente.
8. Influencia del agua.
9. Tiempo de reacción.
10. Modificación de la enzima.

El comentario de estos puntos se va a centrar en la utilización de lipasas microbianas para la síntesis de ésteres de ácidos 2-aril-propiónicos, y particularmente el ibuprofeno. Es importante señalar que estos factores citados pueden afectar tanto a la velocidad de **esterificación** como a la enantioselectividad. No siempre la mayor velocidad de esterificación proporcionará la máxima enantioselectividad. Por este motivo, como la enantioselectividad suele ser el factor determinante, las condiciones óptimas no siempre coinciden con las de la máxima velocidad de esterificación.

Fuentes de lipasas microbianas

Existe un gran número de microorganismos productores de lipasas cuyos preparados **enzimáticos** se pueden obtener comercialmente de diversos proveedores. De hecho Mustranta (1992) realizó un amplio estudio para determinar el tipo de lipasas más adecuado para la resolución del ibuprofeno racémico mediante la esterificación en medio orgánico. En la tabla 1.13 se recogen los preparados utilizados ampliados con los utilizados por otros grupos de investigación.

Suministrador	Origen microbiano
Biocatalyst (UK)	<i>Candida rugosa</i>
	<i>Geotrichum candidum</i>
	<i>Rhizopus arrhizus</i>
	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Penicillium cyclopium</i>
Amano Pharmaceutical (JP)	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Candida rugosa</i>
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	<i>Mucor javanicus</i>
Sigma (USA)	<i>Rhizopus arrhizus</i>
	<i>Candida rugosa</i>
	Extracto de páncreas porcino
Meito-Sangyo (JP)	<i>Candida rugosa</i>
BDH (UK)	<i>Candida rugosa</i>
Novo Industri (DM)	<i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme® IM)
	<i>Candida antárctica</i> (Novozyme® 435)

Tabla 1.13: Principales lipasas comerciales probadas para la esterificación de ácidos 2-aril-propiónicos en medio orgánico (Mustranta, 1992).

De todos estos preparados enzimáticos los únicos que fueron capaces de realizar la síntesis del ibuprofeno fueron los derivados de *Candida rugosa*, *Mucor javanicus*, y los preparados de Novo Industri de *Rhizomucor miehei* y *Candida antártica*, catalizando preferencialmente la esterificación del S-enantiómero. Mustranta (1992) centró sus estudios en el preparado de *Candida rugosa* por la mayor enantioselectividad mostrada en comparación con la de *Rhizomucor miehei* bajo las mismas condiciones de ensayo. Pero también existen estudios interesantes de la resolución del ibuprofeno con *Mucor javanicus* (Goto *et al*, 1996), *Rhizomucor miehei* (López-Belmonte *et al*, 1997) y *Candida antártica* (Arroyo y Sinisterra, 1994).

Es muy curioso también ver las diferencias manifiestas entre los preparados suministrados por los diversos proveedores. Si bien esta dispersión podría entenderse entre diferentes suministradores, se han encontrado discrepancias en las propiedades catalíticas de un mismo suministrador dependiendo del lote utilizado. Estas variaciones muchas veces no sólo deben imputarse al suministrador, sino también a la manipulación del preparado y al almacenamiento del mismo (Tsai y Dordick, 1996b).

Mustranta (1992) presenta una interesante tabla de comparación entre la lipasa de *Candida rugosa* en función del suministrador. Los parámetros de comparación utilizados fueron:

1. La actividad lipolítica determinada a partir de la reacción de hidrólisis del aceite de oliva y expresada en unidades de actividad por mg.
2. El contenido en proteína como % en peso seco utilizando el método de Lowry.
3. El rendimiento de la reacción de esterificación 12mM de ibuprofeno, utilizando alcohol amílico 24 mM en n-hexano y expresado como $\mu\text{mol/g}$ de lipasa.

Los resultados se recogen en la tabla 1.14. En dicha tabla se observa una correlación entre los valores de actividad de hidrólisis frente a aceite de oliva con los de esterificación de ibuprofeno, mientras que esta correlación no existe en el caso del contenido en proteína total. Según esto, una medida de actividad lipolítica sería más representativa que una de proteína total.

Suministrador	A. Lipolítica (U/mg) (aceite de oliva)	Proteína (%)	Rendimiento de la esterificación de ibuprofeno ($\mu\text{mol/g}$ de lipasa)
Biocatalyst	670	10.0	480
Meito-Sangyo	750	12.9	432
Amano	145	9.0	168
BDH	77	7.3	48
Sigma	85	7.0	24

Tabla 1.14: Comparación de la lipasa de *Candida rugosa* dependiendo del suministrador.

Tipos de alcoholes y ácidos utilizados.

Con relación al tipo de alcohol, en general se puede afirmar que, independientemente del origen de la lipasa microbiana, la máxima velocidad de esterificación se obtiene para alcoholes primarios, disminuyendo para alcoholes secundarios y siendo nula para alcoholes terciarios. Esta tendencia se observa con *Candida rugosa* (Mustranta, 1992) *Rhizomucor miehei* (López-Belmonte *et al.*, 1997) y *Candida antártica* (Arroyo y Sinisterra, 1994).

Si se compara el efecto del número de átomos de carbono de los alcoholes primarios lineales, se observa que los alcoholes de cadena corta (metanol, etanol) presentan una baja actividad ya que son capaces de deshidratar la enzima (Gorman y Dordick, 1992). No tan clara es la selección entre el propanol o el butanol y uno de cadena más larga como el octanol, obteniéndose resultados contradictorios en función de la lipasa microbiana utilizada. La utilización de alcoholes ramificados cortos como el 3-metil-1-butanol provocan una importante disminución de la velocidad de esterificación, debido a impedimentos estéricos, de manera que el radical metilo en la posición 3 puede impedir el acercamiento del alcohol al centro activo de la enzima.

Parece claro que serán los alcoholes hidrofóbicos los más apropiados para ser reconocidos por el centro activo de la lipasa debido a su conocida naturaleza hidrofóbica. No obstante éste no debe ser el único parámetro considerado y parámetros como la geometría de

los alcoholes deben ser también tenidos en cuenta. En cuanto a la enantioselectividad el alcohol puede influir de manera importante. Así con Lipozyme las largas cadenas lineales parecen incrementar la enantioselectividad. Estos resultados estarían de acuerdo con los observados en la **esterificación** del ácido octanoico con diferentes alcoholes quirales (Gatfield, 1984). Como conclusión los alcoholes más comúnmente utilizados para la resolución del ibuprofeno son propanol, butanol y octanol.

Aunque nuestro estudio se centra en la resolución del ibuprofeno se han realizado estudios con otros ácidos **2-aril-propiónicos**. Concretamente con Lipozyme López-Belmonte *et al.* (1997) obtienen que el rendimiento sigue el siguiente orden después de 72 horas de operación:

Ibuprofeno > naproxeno > ketoprofeno > ácido 2-fenil-propiónico

Esta tendencia es diferente para el Novozyme (Arroyo y Sinisterra, 1994) igualmente después de 72 horas de operación:

Ketoprofeno > ibuprofeno > ácido 2-fenil-propiónico > flurbiprofeno > naproxeno

Independientemente de los rendimientos y del origen del preparado enzimático la enantioselectividad expresada como relación o "enantiomeric ratio" es baja en todos los casos, puesto que no supera el valor de 4.

A destacar que si bien la resolución es mayoritariamente del **S-enantiómero**, en el caso del ketoprofeno el enantiómero mayoritario que se resuelve es el **R-enantiómero**.

Relación ácido-alcohol empleada.

Generalmente se trabaja con exceso del compuesto no quiral, que en la reacción a estudio sería el alcohol con objeto de asegurar la completa conversión del reactivo enantiomérico. En la bibliografía se recogen relaciones desde 1:1 hasta un máximo de 1:4.

Concentración de la enzima

Existe un óptimo de concentración del preparado **enzimático** a utilizar. Este óptimo corresponde a la máxima productividad expresada como **µmoles** de producto/substrato (producido-consumido) por mg del biocatalizador y hora. En la práctica se observa que a partir de una determinada concentración de la enzima la conversión final o la evolución de la curva del éster producido frente al tiempo es constante.

Algunos autores comentan que cuanto mayor sea la concentración de la enzima se puede observar una disminución en la enantioselectividad. De todas maneras este es un efecto presente cuando se comparan diferentes cantidades de enzima utilizadas a un mismo tiempo de reacción, básicamente porque para altas concentraciones de enzima la conversión supera el 50% y por consiguiente se está sintetizando el éster del **R-enantiómero** una vez que prácticamente se ha consumido todo el **S-enantiómero**. Este descenso de enantioselectividad no sería tal y se podría evitar simplemente parando la reacción antes.

Aunque es difícil comparar entre las diferentes enzimas, en la tabla 1.15 se presentan las cantidades utilizadas por diversos autores.

Fuente Bibliográfica	Preparado enzimático	Volumen de reacción (ml)	Cantidad utilizada (mg)
Mustranta (1992)	<i>C. rugosa</i> (Biocatalyst)	40	100-500
Arroyo y Sinisterra (1994)	<i>Candida antarctica</i> Novozyme 435 (Novo)	10	100-500
Kim y Lee (1996)	<i>C. rugosa</i> (Sigma)	10	300-500
Goto <i>et al.</i> (1996)	<i>C. rugosa</i> (Amano) <i>M. Javanicus</i> (Amano)	-	0.2 g/l
López-Belmonte <i>et al.</i> (1997)	<i>Rhizomucor miehei</i> Lipozyme IM20 (Novo)	10	300-700
Tsai <i>et al.</i> (1997)	<i>C. rugosa</i> (Meito Sangyo)	25	250

Tabla 1.15: Cantidades utilizadas de diferentes preparados de lipasas comerciales.

De la tabla 1.15 se desprende que la concentración de enzima utilizada está comprendida entre 2.5 g/l y 70 g/l si exceptuamos la última referencia. Siendo un valor bastante común 30 g/l.

Concentración de los sustratos

Es otro de los puntos a optimizar dependiendo de la enzima utilizada y de la reacción en que se aplique. Se han observado efectos inhibitorios a medida que se aumentan las concentraciones tanto del ácido como del alcohol. Hay que tener en cuenta que un exceso de ácido puede disminuir el pH microambiental alrededor del centro activo de la enzima, mientras que un exceso de alcohol puede desnaturalizar la enzima.

Las máximas concentraciones de ácido referenciadas en la bibliografía han sido de 125mM utilizando idéntica concentración de alcohol. (López-Belmonte *et al.*, 1997). No obstante generalmente las concentraciones de ácido suelen ser menores, del orden de 50 mM, y en algunos casos extremadamente bajas 3mM (Tsai *et al.*, 1997). La importancia de trabajar a las mayores concentraciones posibles es clara desde el punto de vista de aplicación industrial del proceso.

Factores físicos externos

La temperatura es uno de los factores externos más estudiados debido a su influencia en la actividad **enzimática**. Generalmente un aumento de la temperatura supone un aumento de la velocidad de reacción, siempre que no se produzca la desactivación térmica de la enzima. Sin embargo este efecto es contrario si se sigue el criterio de favorecer la enantioselectividad. Esta se encuentra favorecida a temperaturas bajas. A altas temperaturas se puede producir la "deformación" del centro activo, lo que se traduce en una flexibilidad del reconocimiento del sustrato. Mientras que a bajas temperaturas el centro activo se encontraría más rígido. Por consiguiente será un parámetro a optimizar.

No obstante, hay otros factores externos que pueden determinar la temperatura a emplear como el punto de ebullición del disolvente o de los sustratos/productos que

determinará el óptimo de temperatura. Generalmente la temperatura utilizada se sitúa alrededor de los 40°C.

La agitación es un factor menos estudiado y que aparentemente entre 300 y 700 rpm (con agitación magnética) no parece afectar **significativamente** a las prestaciones de la reacción **enzimática**.

Tipo de disolvente

El estudio de la naturaleza del disolvente ha sido fuente de muchos trabajos y se ha demostrado la gran influencia que tiene sobre la actividad y estabilidad de la enzima (Kvittingen, 1994; Carrea *et al.*, 1995; Ducret *et al.*, 1998). Es un hecho que la actividad catalítica de las lipasas microbianas en medios orgánicos es mayor en disolventes no polares que en disolventes de naturaleza más hidrofílica, incluso miscibles en agua.

El parámetro que se utiliza para cuantificar la relación entre la hidrofobicidad y la hidrofiliidad es el log P, que corresponde al coeficiente de partición del disolvente entre el sistema de dos fases 1-octanol/agua. En la tabla 1.16 se recogen los valores de log P para diversos disolventes.

Disolvente	Log P
Acetona	-0.25
Dietileter	0.85
Cloroformo	2.00
Tolueno	2.50
Pentano	3.00
Ciclohexano	3.20
n-Hexano	3.50
Heptano	4.00
Isooctano	4.50
Decano	5.60

Tabla 1.16.: Valores de log P para distintos disolventes (Laane *et al.*, 1987).

El valor de log P por debajo del cual no se observa actividad enzimática dependerá del tipo de lipasa microbiana. Por ejemplo, para Lipozyme® IM20 de Novo Nordisk (lipasa de *Rhizomucor miehei*) sólo aparece actividad por encima de valores de 2, mientras que para *Candida rugosa* el valor mínimo es del orden de 3. Estas variaciones se justifican por el hecho de que para disolventes por debajo del valor de 2 del log P, los disolventes son capaces de separar el agua esencial de las enzimas, que juega un papel primordial en el mantenimiento de la conformación nativa de la enzima (Reslow *et al.*, 1992).

Las diferencias observadas para preparados diferentes no sólo se deben a diferente origen microbiano, sino que también tienen una fuerte dependencia de si se trata de enzimas inmovilizados o libres. En el primer caso, el soporte es un factor muy importante ya que muchas veces actúa de reservorio de agua, impidiendo la pérdida de la capa de hidratación. En el segundo caso, cuando los enzimas son libres, también hay que tener en cuenta los estabilizantes, conservantes y otros compuestos que acompañan a la mayoría de enzimas comerciales cuya naturaleza es habitualmente hidrofílica y que, por tanto, pueden ayudar a preservar el agua que tiene la enzima.

La relación entre log P y la conversión parece clara, cuanto mayor es log P mayor es la conversión. No obstante, esta correlación es mucho más difusa al compararse con la enantioselectividad, en cuyo caso no existe una relación clara. Estudios recientes (Ducret *et al.*, 1998) con lipasa B de *Candida antártica* atribuyen diferencias de enantioselectividad y conversión a la conjunción de dos factores como son el log P y la actividad de agua del medio, además de sugerir el uso de otras características del disolvente, como la constante dieléctrica, el índice normalizado de acotación de electrones o la solubilidad de Hildebrand como parámetros de comparación.

Los disolventes más utilizados son isooctano y n-hexano, este último pese a tener un log P menor y menores prestaciones (Vázquez-Lima *et al.*, 1995) es muy utilizado debido a su amplio uso en procesos industriales (Mustranta, 1992).

Influencia del agua

El efecto del agua en reacciones en medio orgánico ha sido objeto de estudio en multitud de reacciones y en todo tipo de procesos (Vázquez-Lima *et al.*, 1995; Furutani *et al.*, 1997; De Castro y Gago, 1998), dando lugar a un conjunto de sistemas cuya función es la de controlar este factor.

Wehtje *et al.* (1997) recogen diversos sistemas de eliminación y control de la actividad de agua para sistemas en discontinuo y continuo con diferentes configuraciones, por ejemplo, para un reactor de lecho fijo proponen acoplar un sistema compuesto de un primer reactor sin control de actividad de agua donde se alcanza una parte de la conversión, seguido de una trampa para eliminar el agua que forma una fase diferente del medio y tras esto un segundo reactor de silicona permeable sumergido en una disolución con actividad de agua constante donde se alcanza una conversión final del orden del 95 % (Fig. 1.13).

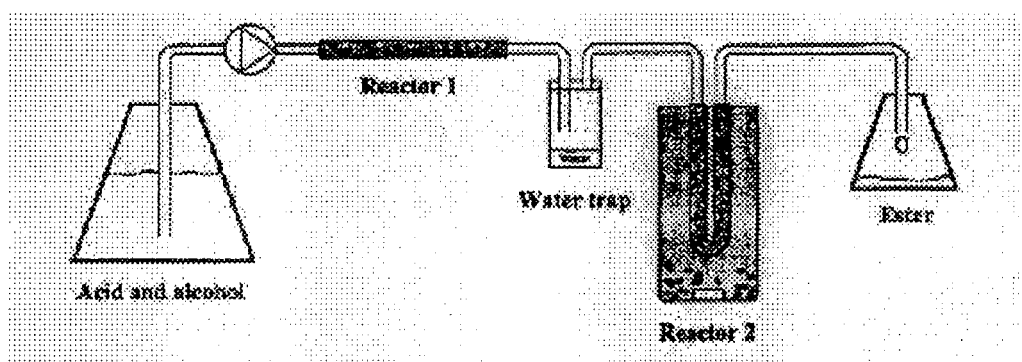


Fig. 1.13: Sistema de control de actividad de agua diseñado por Wehtje *et al.* (1997).

Otros autores diseñan diversos sistemas de control o eliminación de agua, como son evaporación o pervaporación (Van der Padt *et al.*, 1993; Kwon *et al.*, 1995) mediante el acoplamiento de condensadores, la adición de tamiz molecular (Vázquez-Lima *et al.*, 1995; Han y Rhee, 1998) o ajustando el medio de reacción a una actividad de agua fijada por el contacto con una sal de hidratación conocida (Svensson *et al.*, 1994; Dudal y Lortie, 1995).

En el caso de la esterificación de los ácidos 2-aril propiónicos, el contenido de agua del medio ha sido objeto de discusión por lo que se refiere a su efecto en la conversión y en la enantioselectividad. Así, para la esterificación del ibuprofeno, Mustranta (1992) señala que usando enzima libre, la presencia de agua disminuye la conversión por la reversibilidad de la reacción, asimismo, con lipasa de *Candida rugosa*, la enantioselectividad era menor cuanto mayor era el contenido en agua, explicando esto en términos de rigidez de la enzima. Por otro lado, Kim y Lee (1996), utilizando también lipasa de *Candida rugosa* para la resolución del ibuprofeno encuentran que añadiendo silica gel y diferentes porcentajes de agua a distintos disolventes, incrementan la enantioselectividad hasta 16 veces.

López-Belmonte *et al.* (1997) han descrito recientemente con lipasa de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme IM 20) para la esterificación de ibuprofeno en ciclohexano que realizando un diseño de experimentos factorial el factor más influyente en el rendimiento de la reacción era el contenido en agua del medio, viniendo este contenido regulado por la capacidad del soporte de inmovilización de captar parte del agua formada.

Por otro lado, Ducret *et al.*, (1998) hacen un estudio riguroso de la esterificación del ibuprofeno con lipasa de *Candida antártica* tipo B (Novozym 435) con distintas actividades de agua y su influencia en la enantioselectividad obtenida. En este trabajo se constata como cada enantiómero presenta un comportamiento distinto a variaciones en el contenido de agua, resultando así una dependencia entre la enantioselectividad y el contenido en agua. Así, con disolvente hidrofóbicos con actividad de agua controlada se obtiene una mayor conversión, pero los mejores resultados en términos de enantioselectividad se obtiene con disolventes más hidrofílicos.

Por último, señalar que recientemente el empleo de las isotermas de adsorción de agua tanto de enzimas libres como inmovilizados se ha demostrado como una herramienta útil para predecir las necesidades de agua y el comportamiento de los preparados enzimáticos en medio orgánico (De la Casa *et al.*, 1996).

Tiempo de reacción

Este es un factor muy variable y que dependerá en gran medida de la carga **enzimática** utilizada, y de otros factores clave como lipasa utilizada, contenido de agua, disolvente, temperatura, etc. pero recopilando los trabajos sobre el tema se puede generalizar a que un tiempo mínimo de reacción estará entre las 24 y las 48 h, mientras que la mayoría de casos se sitúa entre las 100 y 200 horas, pudiendo llegar hasta 500 horas de reacción.

Modificación de la enzima

Algunos autores proponen algún tipo de modificación de la enzima para la mejora de la actividad enzimática. Así, para la **esterificación** del ibuprofeno Goto *et al.* (1996) desarrollan un biocatalizador a partir de la interacción entre la enzima y un surfactante, obteniendo aumentos importantes en la conversión para las lipasas de *Mucor javanicus* y *Candida rugosa* pero sin describir una importante mejora en la enantioselectividad. Otros autores también describen la adición de surfactantes para mejorar la productividad y selectividad en la resolución del naproxeno (Tsai *et al.*, 1996a).

Otra posibilidad descrita en la bibliografía es el empleo de los denominados CLEC ("cross-linked enzyme crystal"). En concreto, Lalonde *et al.* (1995) describe el uso de este tipo de cristales de lipasa de *Candida rugosa* en la resolución de ácidos 2-aril propiónicos, obteniendo mejoras en la estabilidad de la enzima y en la enantioselectividad de la reacción.

En este capítulo también se puede incluir las modificaciones originadas al utilizar las lipasas inmovilizadas covalentemente. En este tipo de inmovilización se produce siempre una modificación química en alguno o algunos aminoácidos de la proteína, lo que puede provocar cambios en la actividad y enantioselectividad de la enzima (Sánchez *et al.*, 1996; Moreno *et al.*, 1997).

Otro tipo de modificaciones son las originadas por el hecho de tratar la enzima con disolventes polares de cadena corta. Así, Chamorro *et al.* (1998) describen como el tratamiento del crudo de lipasa de *Candida rugosa* proporcionado por Sigma con disolventes

orgánicos polares de cadena corta (metanol, etanol, 1 y 2-propanol, 1 y 2-butanol y acetona) origina mejoras en la actividad tanto en reacciones de hidrólisis como en reacciones de **esterificación** y **transesterificación** en las que participa el ketoprofeno. Los autores sugieren que este tratamiento modifica la enzima por apertura de la tapa descrita por Grochulski *et al.* (1994).

1.7.6. Resolución de *trans*-2-fenil-ciclohexanol con lipasas

El interés de este producto es debido a que se trata de un auxiliar quiral utilizado en procesos de inducción asimétrica que se puede obtener de forma **enantioméricamente** pura por vía **enzimática** y que permite la substitución de otros productos como 8-fenil-mentol (Novak y Zemis, 1985).

En la bibliografía existen pocas referencias en las que se haga referencia a la resolución de este compuesto mediante lipasas. En concreto Basavaiah y Rao (1994) usando esterasa de hígado de pollo en reacción de hidrólisis obtuvieron purezas enantioméricas superiores al 99 % para conversiones entre el 20 y el 30 % pero con tiempos de reacción del orden de 10-12 días.

Más recientemente, Carpenter *et al.* (1996) describen la resolución del *trans*-2-fenil-ciclohexanol utilizando Lipasa Amano PS30 (*Pseudomonas cepacia*) y obteniendo resultados superiores al 99 % de exceso enantiomérico.

1.8. Valoración económica de procesos

1.8.1. Estimación de las partidas necesarias

Una metodología descrita para la evaluación de procesos químicos se detalla en los trabajos de Vián (1991) y Peters y Timmerhaus (1980). Esta metodología consta de los siguientes pasos:

1. **Estimación de las ventas:** conociendo el precio del producto en el mercado o bien estimando su valor a partir de la rentabilidad que se quiera obtener con el proceso y conociendo los costes totales. Otra opción es a partir de coeficientes de giro que relacionan las ventas con el valor del inmovilizado (Vián, 1991).
2. **Estimación de la partida de inmovilizado:** incluye los equipos necesarios para la construcción de la planta y aunque existen diferentes métodos aproximados como coeficientes de giro o la regla de Williams (Vián, 1991) la mejor evaluación es determinar el precio de mercado de los equipos que se vayan a utilizar en el proceso. En el trabajo de Happel y Jordán (1981) se presentan abundantes técnicas y datos para estimar el valor de esta partida.
3. **Estimación del capital circulante:** referido el capital que entra en el ciclo de producción pero que es retornado incluye valor de materias primas en existencia, de productos aún no cobrados, en almacén o en ciclo de producción así como repuestos y existencias en caja, bancos o valores. Suele estimarse como un porcentaje del inmovilizado (Vián, 1991).
4. **Estimación de costes:** los costes se dividen en dos tipos que a su vez se dividen en varios subtipos:
 - a) **Costes de fabricación:** que se dividen en:
 - Costes directos: asociados directamente a la fabricación del producto:
 - Materia prima
 - Mano de obra directa

- Patentes

Costes indirectos: no asociados al producto:

- Mano de obra indirecta

- Servicios generales

- Suministros

- Conservación

- Servicios generales

- Mantenimiento

- Laboratorio

- Envasado

- Expedición

- Directivos y técnicos

- Amortización

- Alquileres

- Impuestos

- Seguros

b) Costes generales:

- Gastos comerciales

- Gerencia

- Gastos financieros

- Investigación y servicios técnicos

La mayoría de los costes se determinan en base al valor de la partida de inmovilizado, asignándoles un porcentaje de esta partida. Distintos criterios de evaluación de los costes se presentan en los trabajos de Vián (1991) y Peters y Timmerhaus (1980).

El valor de la partida de amortización suele determinarse aparte y corresponde a repartir a lo largo de los diferentes ejercicios el coste total de la partida de inmovilizado. Existen distintos criterios de amortización, constante, regresiva, suma de dígitos, saldo decreciente que se aplicarán en función de las necesidades del proceso (Vián, 1991).

1.8.2. Cálculo de Net Cash Flow (NCF) y Rent Discounted Cash Flow (RDCF)

Una vez conocidas las distintas partidas necesarias para la evaluación del proceso, la rentabilidad de un proceso se suele evaluar por el valor del **RDCF** ("Rent Discounted Cash Flow") que es el valor del interés para el cual el valor actual neto (VAN) de todos los ingresos y desembolsos es nulo para la inversión propuesta. En función de este valor se decidirá si la inversión es lo suficientemente atractiva.

Un análisis detallado del cálculo y significado del **RDCF** se presenta en el trabajo de **Richart** (1977). En general, el RDCF será el valor de i que hace que la ecuación (11) se cumpla:

$$VAN = \sum_{j=0}^t \frac{NCF_j}{(1+i)^j} = 0 \quad (11)$$

donde i es el valor del RDCF que queremos calcular, t es el valor en años que dura el proceso (su vida esperada) y NCF ("Net Cash Flow") el movimiento neto de caja para cada año que se puede calcular de forma simple como:

$$NCF = \text{Beneficios netos} - \text{Capital Inmovilizado}^{(*)} \pm \text{Capital Circulante}^{(**)}$$

* Suele aplicarse el año 0

** De signo negativo en el año 1 y de signo positivo en el año t

$$\text{Beneficios netos} = \text{Base imponible} \cdot (100 - \% \text{ de Impuestos}^{(*)}) / 100$$

* Se empiezan a pagar en el año 2

$$\text{Base imponible} = \text{Ventas} - \text{Costes} - \text{Amortización}$$

para cada año j se calcula el valor del NCF que después se actualiza con el factor $1/(1+i)^j$ para cada año. La suma de NCF actualizados es lo que se conoce como VAN y el valor de i para el que el VAN es cero se conoce como RDCF.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del trabajo es la utilización de las lipasas producidas por *Candida rugosa* mediante fermentación a escala piloto en la resolución de compuesto quirales con aplicabilidad en la industria farmacéutica.

Este objetivo general consta de los siguientes objetivos parciales:

1. Desarrollo de la mejor secuencia de **separación** para la obtención de la enzima en estado sólido a partir del medio de fermentación con la menor pérdida de actividad posible.
2. **Estudio económico** de la viabilidad del proceso de producción de lipasas de *Candida rugosa* mediante fermentación.
3. **Caracterización y purificación** de las diferentes proteínas que contiene el preparado sólido obtenido y comparación con las descritas para lipasas de *Candida rugosa* comerciales.
4. Utilización de la lipasa UAB libre en **reacciones de síntesis** en medio orgánico y comparación de la actividad catalítica de la lipasa UAB en estos medios con lipasas de *Candida rugosa* comerciales.
5. **Diseño de una biocatalizador** con lipasas UAB inmovilizadas en algún soporte que permita su uso en medio orgánico y su recuperación del medio. Comparación con lipasas comerciales inmovilizadas.
6. Puesta a punto de los **métodos analíticos y de cálculo** necesarios para el seguimiento de las reacciones de síntesis de naturaleza quiral, así como de la optimización de las condiciones de reacción.

7. Utilización de la lipasa **UAB** inmovilizada en la **resolución de compuestos quirales** de interés farmacéutico. Resolución de derivados 2-aril propiónicos y del *trans*-2-fenil-ciclohexanol mediante **esterificación** en medio orgánico. Determinación de las condiciones óptimas de reacción.

8. Diseño de un sistema **en continuo** para la producción de compuestos enantioméricamente puros mediante lipasas **UAB** y comerciales. Estudio de la estabilidad del reactor, descripción de un modelo de flujo y reutilización de la enzima.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1.1. Fermentación

3.1.1.1. Montaje experimental de la fermentación

Para el crecimiento de la levadura y correspondiente producción de lipasas se emplearon los siguientes fermentadores:

- Un fermentador Braun Biolab de 1.5 litros de capacidad máxima, con 0.5 litros de volumen de trabajo.
- Un fermentador Braun Biostat E de 6.4 litros de capacidad máxima, con 5 litros de volumen de trabajo.
- Un fermentador Braun Biostat UD con cuba de acero inoxidable de 70 litros de volumen máximo y un volumen de trabajo de 55 litros.

El fermentador posee diversos módulos de control de variables de proceso que permiten fijar diferentes puntos de consigna. Las variables sobre las que se tiene posibilidad de realizar una acción de control son:

- Temperatura: 30°C.
- Porcentaje de oxígeno disuelto: 30-40 % de saturación.
- pH: 6.3.
- Control de la velocidad de agitación: 500 rpm para todos los casos excepto en el Braun Biostat UD donde se trabajó a 400 rpm.

Asimismo, la adición de la fuente de carbono (ácido oleico) se realiza mediante una microbureta Crison microBUR 2031. Permite el empleo de jeringas de diferentes volúmenes utilizándose una jeringa Hamilton modelo 1001 TLL de 1 ml de capacidad total. Para el fermentador Biostat UD se emplea una jeringa de 2.5 ml de capacidad total. Dispone de una entrada RS232 lo que permite la comunicación con el ordenador principal que gestionará los volúmenes adicionados y la frecuencia de adición.

Como otra instrumentación utilizada cabe señalar:

- Cámara de flujo laminar Telstar BH-10.
- Autoclave Hirayima manufacturing corporation HA-30.
- Autoclave P-Selecta.
- Microscopio Olympus BH-2.
- Microscopio Zeiss Axioskop.
- Estufa de inoculación de placas Memmert: Edelstarht Rost Frei.

3.1.1.2. Medio y reactivos de la fermentación

Reactivos de fermentación:

- Agua desionizada
- Extracto de malta Adsa-Micro
- Extracto de levadura Pronadisa
- Triptona Adsa-Micro
- Agar bacteriológico Adsa-Micro
- KH_2PO_4 Panreac para análisis
- K_2HPO_4 Panreac para análisis
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ Panreac para análisis
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Panreac para análisis
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Panreac purísimo
- NH_4OH 30% Panreac para análisis
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Panreac purísimo
- Inositol Fluka para microbiología
- Biotina Fluka para microbiología
- Tiamina.HCl Fluka para microbiología
- Antiespumante Braun Biotech
- Ácido oleico Sigma purísimo

El medio de cultivo está formado por una solución básica de composición por litro: KH_2PO_4 , 15 g; K_2HPO_4 , 5.5 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g; biotina, 0.008 mg; tiamina.HCl, 0.2 mg; inositol, 0.004 mg y FeCl_3 , 10 mg.

3.1.1.3. Mantenimiento de la levadura y sistema de inóculos

En este trabajo se ha utilizado la levadura *Candida rugosa* ATCC 14830. La levadura era mantenida a -20°C en anillos porosos en glicerol, mediante el kit Microbank® de Pro-Lab Diagnostics. La cepa es traspasada a una placa de petri conteniendo agar con extracto de malta donde es incubada durante 48 h a 30°C . Esta siembra de placas se realiza por triplicado. A partir de una de las placas se inocula una botella de 250 ml con 50 ml de volumen útil conteniendo 2 g/l de ácido oleico y el medio especificado. Las botellas se realizan por duplicado y su tiempo de inoculación se fija en 24 h. A partir de una de las botellas se inocula el fermentador Braun Biolab de 0.5 l de volumen conteniendo 4 g/l de ácido oleico y el medio especificado. En esta fermentación, cuya duración es de 24 h, no se tiene control del pH ni del oxígeno disuelto. Los 0.5 l de este fermentador sirven de inóculo para el Braun Biostat E, donde se repite la operación en discontinuo llevada a cabo en el fermentador Braun Biolab pero con 5 l de volumen, que servirán de inóculo para el fermentador piloto Braun Biostat UD.

En este fermentador, un proceso en discontinuo de 2 g/l de ácido oleico precede a la operación en fed-batch a caudal de adición constante de 0.2 g/(h·l fermentador). Este caudal se añade mediante una microbureta programada. La duración del proceso en discontinuo es del orden de 10 h, mientras que la del fed-batch es del orden de 30 h. En las dos últimas etapas de la fermentación, se sigue un control riguroso de los parámetros físicos de sistema, como temperatura, pH, oxígeno disuelto y agitación, así como de los parámetros biológicos, de los que se siguen biomasa, actividad lipolítica y observaciones al microscopio.

Una descripción detallada del sistema experimental de fermentación y de la instrumentación desarrollada se encuentra en los trabajos de Gordillo (1996) y Sanz (1998).

3.1.2. Separación

Para la separación de la lipasa del medio de cultivo se utilizó la siguiente instrumentación:

- 1) Centrifugación: centrífuga en continuo Westfalia Separator AG (CSA 1-06-475) trabajando a 3000g y 20 l/h. Para volúmenes menores de 5 litros se utilizaron las siguientes centrífugas:
 - Centrífuga Kontron Analytical Centrikon/H-401.
 - Centrífuga Heraeus Sepatech Megafuge 1.0.
 - Centrífuga Beckman J2-21M/E.
- 2) Microfiltración 0.45 μm : Minitan® Millipore con 4 membranas PVDF 0.45 μm de corte. Para volúmenes menores a 5 l se puede utilizar un sistema tradicional de filtración al vacío mediante filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/F) de 0.45 μm de tamaño de poro.
- 3) Ultrafiltración 10 kDa: Centrasette® Pall Filtron con 1 membrana OMEGA 10K de corte. Otros sistemas alternativos para volúmenes menores son los siguientes:
 - Sistema Minitan® Millipore equipado con 4 membranas PMNL de 10 kDa de corte para volúmenes no superiores a 5 l.
 - Sistema Prep/Scale TTF® Millipore con un PTGC 10 K 2.5 ft² Cartridge hasta 15 l.
- 4) Precipitación de la proteína:
 - Precipitación con etanol: la muestra se trata con 2 volúmenes de etanol a 0°C. La solución se mantiene constantemente agitada a 0°C durante la adición y se deja agitando durante 1 h. La proteína precipitada se separa por centrifugación a 3000g y el pellet se seca a temperatura ambiente.
 - Precipitación con sulfato amónico: se añaden a la muestra diversas cantidades de sulfato (Harris and Angal, 1989). La solución se mantiene constantemente agitada a 0°C durante la adición y se deja agitando durante 1 h. La proteína precipitada se separa por centrifugación a 3000g y el pellet se seca a temperatura ambiente.
- 5) Liofilización: las muestras se congelan previamente con nitrógeno líquido o una mezcla de nieve carbónica/acetona y se liofilizan durante 24 h en un liofilizador Virtis Sentry 5L.

3.1.3. Cromatografía en FPLC

El equipo utilizado fue un FPLC System de Pharmacia Biotech equipado con dos bombas Pharmacia LKB-Pump P-500, un controlador Pharmacia LKB Controller LCC-500 CI, un detector de ultravioleta Pharmacia Monitor UV-M y un colector de fracciones Pharmacia LKB-Frac-200, todo ello comandado por un ordenador con el software Pharmacia FPLC Director 1.03.

3.1.3.1. Cromatografía de intercambio iónico

En este caso, se utilizaron dos columnas basadas en este principio:

- Millipore DEAE Memsep® 1000 (1 ml).
- Columna Pharmacia HR 5/5 (1 ml) utilizando relleno Pharmacia Source® 15Q.

Para la separación por cromatografía de intercambio iónico se utilizaron dos métodos distintos:

- 1) Método en escalón: se preparaban dos tampones denominados A y B de Tris-HCl 20 mM a pH=7.40. En el buffer B había además, NaCl de concentración 1 M. Con estos tampones de seguía el patrón descrito en la figura 3.1.
- 2) Método de gradiente: se preparaban los mismos tampones pero la evolución de la concentración de NaCl era en forma de gradiente. Este sistema también se muestra en la figura 3.1

La concentración óptima de muestra inicial para este tipo de cromatografía es de 1-10 mg polvo liofilizado/ml de buffer A, centrifugados a 10000g previamente a la inyección. Un volumen de inyección correcto se sitúa entre los 100 y 500 μ l.

La descripción de ambos métodos tal y como se programó con el software empleado se recoge en el capítulo 8.13.

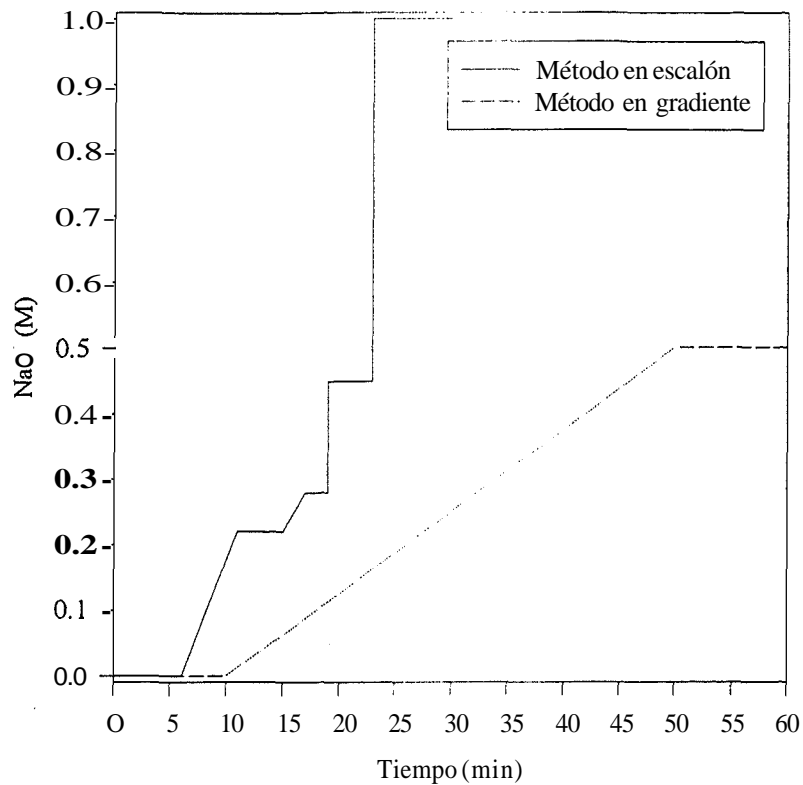


Fig. 3.1.: Distintos métodos para la cromatografía de intercambio iónico.

3.1.3.2. Cromatografía de gel filtración

En este caso, se utilizaron dos columnas:

- Columna Pharmacia HR 10/30 (24 ml) con relleno Pharmacia Superdex® 75 (separación entre 3 y 70 kDa).
- Columna Pharmacia HiLoad® 26/60 (325 ml) con relleno Pharmacia Superdex® 200 (separación entre 10 y 600 kDa).

La cromatografía se realizaba simplemente con un caudal fijo de un tampon Tris-HCl 20 mM a pH=7.40. La concentración óptima de muestra para este tipo de cromatografía es de 1-10 mg polvo liofilizado/ml de buffer A, centrifugados a 10000g previamente a la inyección. Un volumen de inyección correcto se sitúa entre los 0.5 y 5 ml.

La descripción del método empleado tal y como se programó con el software empleado se halla en el capítulo 8.13.

3.1.3.3. Cromatografía de interacción hidrofóbica

El relleno utilizado en este caso fue de Phenyl Sepharose® High Performance de Pharmacia Biotech, introducido en dos columnas Pharmacia HR 5/5 (1 ml) y HR 10/30 (24 ml) dependiendo del volumen de muestra deseado.

En este caso, se requería la preparación de dos tampones A y B de Tris-HCl 20 mM a pH=7.40, con el tampón A conteniendo también sulfato amónico en una concentración de 1.7 M. En este caso, tras 10 minutos de inyección de muestra en el tampón A, se somete a la columna a un gradiente de fuerza iónico decreciente pasando de un 100 % a un 0 % de tampón A, que se substituye paulatinamente por el tampón B.

La concentración óptima de muestra para este tipo de cromatografía es de 1-10 mg polvo liofilizado/ml de buffer A, dejados agitar durante 30 minutos y centrifugados a 10000g previamente a la inyección. Un volumen de inyección correcto se sitúa entre los 100 a 500 µl para la columna HR 5/5 y 1-5 ml para la columna HR 10/30.

La descripción del método tal y como se programó con el software empleado se halla en el capítulo 8.13.

3.1.4. Electroforesis

SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes de acuerdo con los protocolos descritos por Laemmli (1970), en geles al 12 y 15 % de poliacrilamida. Las electroforesis se realizaron en un Mini Protean® II cell de Biorad.

Las proteínas fueron visualizadas con tinción de Coomassie Brilliant Blue o Nitrato de Plata dependiendo de la concentración de proteína y de acuerdo con los protocolos estándar. Los polisacáridos (y glicoproteínas) fueron teñidos con reactivo de Schiff de acuerdo con el protocolo descrito por Jay *et al.* (1990).

3.1.5. Reacciones no quirales

3.1.5.1. Reacciones de hidrólisis

Las reacciones de hidrólisis en medio acuoso tuvieron lugar en el fermentador Braun Biolab con 0.5 l de volumen de trabajo, controlando la agitación, que se mantuvo a 500 r.p.m. y la temperatura, que se mantuvo a 40 °C.

El reactor estaba cerrado al ambiente pero con una entrada superior que se abría para obtener las muestras que una vez filtradas eran introducidas en un baño de agua hirviendo durante 3 minutos con el fin de desactivar la enzima. Un blanco realizado en las condiciones de trabajo no supuso la aparición de hidrólisis apreciable.

3.1.5.2. Reacciones de síntesis

Las reacciones de síntesis en medio orgánico tuvieron lugar en pequeños reactores de 25 ml con 10 ml de volumen de trabajo cerrados herméticamente. La temperatura se mantuvo a 40 °C y las concentraciones de los reactivos fueron de 100 mM si no se especifica lo contrario. Las muestras eran filtradas por 0.45 µm antes de ser analizadas. Las reacciones se llevaron a cabo en un incubador orbital con una agitación de 250 rpm.

3.1.6. Inmovilización

3.1.6.1. Inmovilización sobre Celita y Poliamida

Se disuelve la cantidad necesaria de preparado liofilizado para obtener 15000 U de actividad lipolítica en 1 ml tampón Tris-HCl 20 mM a pH=7.40. Sobre este volumen se añaden 1 g de celita 545 (Fluka) y poliamida 11 (Merck) respectivamente, homogeneizando continuamente la mezcla sólido-líquido. En esta mezcla, una proporción óptima es la de 1 g de soporte/ml de enzima disuelto. Una vez añadida la cantidad total de soporte se liofilizó hasta peso constante. La enzima inmovilizada se guarda a -20°C.

3.1.6.2. Inmovilización sobre Duolite

Se disuelve la cantidad deseada de enzima a inmovilizar (para obtener 100- 1000 U/g de soporte) en tampón Tris-HCl 20 mM a pH=7.40.

El soporte, Duolite® A 568, es humedecido con etanol absoluto a razón de 6 ml/g de soporte, y después se lava una vez con 50 ml de tampón fosfato 0.1 M a pH=7.00 durante 30 minutos y dos veces con el mismo tampón pero 0.01 M durante 30 minutos. Eliminando el líquido del último lavado ya se puede añadir la disolución de la enzima. Se deja agitando la mezcla suavemente (en un roller Movil-Rod de P-selecta) durante 1 h.

Tras este período se filtra la mezcla y se lava el filtro 2 veces con agua destilada. El soporte se deja secar a temperatura ambiente. La enzima inmovilizada se guarda a -20°C.

3.1.6.3. Inmovilización sobre EP100

Se disuelve la cantidad deseada de enzima a inmovilizar (para obtener 100000 U/g de soporte) en tampón fosfato 20 mM a pH=7.00.

El soporte es humedecido con etanol absoluto a razón de 3 ml/g de soporte, Eliminando el etanol ya se puede añadir la disolución de la enzima. Se deja agitando la mezcla suavemente (en un roller Movil-Rod de P-selecta) durante toda la noche.

Tras este periodo se filtra la mezcla y se lava el filtro 2 veces con agua destilada. El soporte se deja secar a temperatura ambiente o mediante un desecador. La enzima inmovilizada se guarda a -20°C.

3.1.7. Reacciones quirales

Dada una reacción de síntesis quiral donde una mezcla racémica compuesta por los enantiómeros R,S reacciona con una agente esterificante para generar dos enantiómeros R y S del éster y agua, se definieron los siguientes conceptos a la hora de seguir una reacción quiral:

Conversión total (X):

$$X = \frac{C_{ester}}{C_{ester} + C_r + C_s} (x100)$$

siendo $C_{\text{éster}}$ la concentración total de éster formado y C_r y C_s las concentraciones de los enantiómeros R y S del reactivo respectivamente.

En el caso de reacciones con elevada enantioselectividad se puede asumir que la conversión respecto al enantiómero que reacciona (XA) es aproximadamente: $XA = 2X$, es decir, suponer que toda la conversión se refiere a uno de los dos enantiómeros. Ambos valores, X y XA tomarán valores desde 0 a 100. En el caso de enantioselectividad perfecta y reacción completa: $X = 50\%$ y $X_A = 100\%$.

Exceso enantiomérico (EE):

$$EE_r = \frac{C_r - C_s}{C_r + C_s} (x100) \quad EE_s = \frac{C_s - C_r}{C_r + C_s} (x100)$$

el exceso enantiomérico siempre se refiere a uno de los dos enantiómeros, y puede referirse al producto o al reactivo. En el caso estudiado, se referirá al exceso enantiomérico del reactivo. El exceso enantiomérico tomará valores entre el 0 y el 100 %.

Pureza (P):

$$Pr = \frac{C_r}{C_r + C_s} (x100) \quad Ps = \frac{C_s}{C_r + C_s} (x100)$$

la pureza, al igual que el exceso enantiomérico, también se refiere a uno de los dos enantiómeros. En el caso estudiado, se referirá a la pureza del reactivo. La pureza tomará valores entre el 0 y el 100 %.

Enantioselectividad (E):

$$E = \frac{\ln[(1-X)(1-EE)]}{\ln[(1-X)(1+EE)]}$$

este valor relaciona la conversión total con el exceso enantiomérico para dar un valor entre 0 para reacción no enantioselectiva e infinito para una reacción perfectamente enantioselectiva. En términos generales, se considera una reacción enantioselectiva a partir de valores de E superiores a 25.

3.1.8. Diseño de experimentos

Por lo que se refiere a la realización del diseño de experimentos, se construyó un programa en lenguaje Fortran utilizando el entorno Microsoft Fortran **Powerstation** versión 4.0 para la resolución de las matrices que se originan en la búsqueda de la función que optimiza los parámetros. Este software hace uso de las librerías **IMSL** incorporadas en el propio entorno. Un ejemplo de programa utilizado se halla en la sección **8.14**.

Para la optimización de la función objetivo se construyó un programa usando el mismo software, como también se describe en la sección **8.14**.

3.1.9. Montaje de las reacciones en continuo

Como RCFP se eligió una columna de acero inoxidable que en realidad era un columna de **HPLC** (Aminex® **HPX-87H** Biorad) vacía de relleno y de dimensiones 30cm x **7.8mm**, con lo que se obtiene un reactor de volumen real de **14.3 ml**.

El montaje consistía en una entrada de alimento cuyo caudal venía regulado por una microbureta programada para añadir cantidades fijas y precisas de alimento. La columna estaba herméticamente cerrada y sumergida en un baño **termostatzado** donde se regulaba la temperatura. Las muestras se tomaban a la salida. Detalles del montaje se presentan en las figuras **4.8.7.a/b**.

En el capítulo **8.15** se presenta el programa desarrollado para controlar la microbureta desde el ordenador mediante el lenguaje Borland Turbo C++ versión 3.0.

3.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.2.1. Fermentación y purificación

3.2.1.1. Determinación de la biomasa por peso seco

Para la determinación del peso seco se filtra un volumen conocido de muestra al vacío mediante un filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/F) de 0.45 μm de tamaño de poro previamente tarado en seco. Seguidamente, se lava con 10 ml de una mezcla de dioxano-propiónico 1:1 (v/v) para arrastrar los restos de ácido oleico que pueda contener la muestra y que interferirían en la medida de la biomasa. A continuación, se lava la muestra con 25 ml de agua destilada y se coloca a 100 °C hasta llegar a peso constante (aproximadamente 12 h).

3.2.1.2. Test de actividad lipolítica por método turbidimétrico

El método consiste en el seguimiento de la variación de la turbidez de un medio tamponado que contiene un triglicérido, trioleína, CaCl_2 para formar los jabones del ácido graso a medida que aparece el ácido oleico en el medio, y un tensoactivo, desoxicolato sódico, que permite la formación de la emulsión. La disminución de la turbidez se debe a la desaparición de la trioleína al ser hidrolizado su enlace éster por acción de las lipasas.

El análisis se realiza regenerando en 5 ml de tampón tris-HCl 200 mM a $\text{pH}=7.40$ la emulsión proporcionada por Boehringer en su test de determinación de lipasas (Kit 159697). A 750 μl de este sustrato se añaden 250 μl de muestra, se agitan previamente y se introducen en una cubeta **termostatzada** a 42 °C, y se realizan lecturas de absorbancia cada 30 segundos durante 7 minutos a 340 nm (previamente se realiza un blanco con agua destilada). Se empleó un Espectrofotómetro UV-VIS Varian Cary 3.

Mediante el calibrado (ver Apéndices 8.1) se convierte el valor de la pendiente (en su parte lineal) en unidades de actividad lipolítica/ml equivalentes al test de valoración. Los resultados obtenidos del valor actividad lipolítica son fiables dentro del rango de 0.2 a 0.45 U/ml. Para muestras fuera de este rango se realizan las diluciones pertinentes.

3.2.1.3. Análisis colorimétrico de la actividad esterásica

Este método se basa en el seguimiento del aumento de absorbancia a 348 nm debido a la formación de ácido *p*-nitrofenilpropiónico consecuencia de la hidrólisis que las lipasas producen sobre el correspondiente éster, el *p*-nitrofenilpropionato (PNPP).

Reactivos

1. Disolución 200 mM de *p*-nitrofenilpropionato (PNPP) en acetonitrilo guardada a -20 °C.
2. Tampon fosfato 0.05 M a pH=7.0.
3. Acetonitrilo.

Procedimiento

Se prepara una solución que contenga un 80 % de tampón fosfato 0.05 M a pH=7.0 y un 20 % de acetonitrilo. Se diluye el PNPP 200 mM 500 veces con la solución anterior. Se lee a 348 nm y a 25 ° C en cubetas de ultravioleta a doble haz y siempre comparando con blancos de hidrólisis. Se empleó un Espectrofotómetro UV-VIS Varian Cary 3.

El volumen del ensayo es de 1 ml, 750 µl de substrato y 250 µl de muestra, se lee la absorbancia durante 6 minutos cada 30 segundos. La pendiente obtenida se correlaciona con la actividad esterásica dentro del rango de 0.005 a 0.030 U/ml (ver Apéndices 8.2).

3.2.1.4. Análisis de proteína total por el método de Lowry

El método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) se basa en la reacción de los aminoácidos aromáticos de las proteínas con una mezcla de molibdato sódico y tungstato sódico en ácido fosfórico (que constituyen el reactivo de Folin-Ciocalteu). Los aminoácidos reducen la mezcla de metaloácidos, produciendo unos compuestos de color azul característico, cuya intensidad es función de la concentración de aminoácidos.

Reactivos

- A. Solución acuosa Na₂CO₃ al 5 %.
- B. Solución acuosa de tartrato sódico potásico al 1 % en la que se disuelve CuSO₄.5H₂O al 0.5 %.

- C. Reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N en H_2SO_4 .
- D. Solución estándar de albúmina de suero bovino 400 $\mu g/ml$.
- E. Solución de NaOH 1 N.

Procedimiento

1. Se añaden 2 ml de B en 48 ml de A inmediatamente antes de la realización del análisis.
2. Se prepara una curva de calibrado (ver Apéndices 8.3) a partir de la solución D con las siguientes concentraciones de albúmina: 0, 20, 40, 80, 120, 160, 240 $\mu g/ml$.
3. A un volumen final de muestra de 0.5 ml se añaden 0.5 ml de E.
4. Añadir 2.5 ml de la mezcla de reactivos preparada en 1, agitar y esperar 10 minutos.
5. Añadir rápidamente 0.5 ml de reactivo C y esperar 30 min (máximo 60 min).
6. Leer la absorbancia a 750 nm.

3.2.1.5. Análisis de proteína total por el método de Bradford

Este método se basa en el cambio de color del reactivo Azul de Coomassie debido a la atracción electrostática de sus grupos sulfónicos con al proteína (Pierce, 1989). Se ha observado que el reactivo Azul de Coomassie muestra gran afinidad por residuos de arginina, y también se une de forma débil con histidina, tirosina y triptófano.

Este método es especialmente útil puesto que presenta un menor número de interferencias que el método de Lowry, siendo recomendable en el caso de medios en los cuales la concentración de sales sea elevada.

Existen dos tipos de procedimientos dependiendo del intervalo de concentraciones de proteína a determinar.

Procedimiento estándar de **ensayo**: para concentraciones entre 100 y 1500 $\mu g/ml$.

1. Agitar previamente el reactivo.
2. Se preparan una serie de concentraciones conocidas de proteína diluyendo una **solución** estándar de albúmina entre 75 y 1500 $\mu g/ml$.
3. Mezclar 0.1 ml de muestra o de patrón con 5 ml de Azul de Coomassie en un tubo 16x100 mm. Usar el disolvente como blanco. Agitar bien.
4. Leer la absorbancia a 595 nm en un tiempo no superior a 90 minutos.
5. Restar la absorbancia del blanco.

Procedimiento de microensayo: para concentraciones entre 1 y 25 $\mu\text{g/ml}$. Se sigue el mismo procedimiento que en el caso estándar pero los patrones se preparan entre 1 y 25 $\mu\text{g/ml}$ (ver Apéndices 8.4) y se mezclan 1 ml del reactivo Azul de Coomassie con 1 ml de muestra.

3.2.1.6. Determinación de los polisacáridos totales por el método de la Antrona

Los polisacáridos se separan de la muestra (300 μl) por **ultrafiltración** mediante un filtro **Ultrafree®-MC** de 10 kDa de corte molecular de Millipore. La muestra se centrifuga (5000g) hasta sequedad. Los polisacáridos que quedan en la superficie del filtro se resuspenden con 300 μl de agua destilada y se centrifuga de nuevo. Este paso se repite 3 veces para separar azúcares de bajo peso molecular. En la resuspensión final de los polisacáridos que quedan en 300 μl se realiza un análisis de azúcares totales por el método de la Antrona (**Gerhardt *et al.*, 1981**).

Este método es una variación del test de Molisch en el cual los polisacáridos son hidrolizados mediante ácido sulfúrico a monosacáridos para formar **furfurales** que reaccionan con la Antrona para dar compuestos coloreados.

Procedimiento

Se prepara una disolución de 1 g/l de Antrona en ácido sulfúrico al 75 % en volumen. La Antrona sólida deseada se humedece previamente con etanol absoluto (5 ml etanol/200 mg Antrona). Agitar hasta disolución (aproximadamente 1 h). Preparar patrones de fructosa de concentraciones entre 0 y 50 $\mu\text{g/ml}$. Añadir 800 μl del reactivo de Antrona a 200 μl de muestra o patrón. Poner las muestras en un baño a 100 °C durante 10 minutos. Sacar las muestras, dejarlas enfriar y leer la absorbancia 625 nm. Restar la absorbancia del blanco y correlacionar los datos con el calibrado de **fructosa** (ver Apéndices 8.5).

3.2.2. Reacciones con lipasas

3.2.2.1. Análisis de ácido propiónico por Cromatografía de Gases

Este método permite la determinación de ácido propiónico en disolventes orgánicos. La cuantificación este se realiza mediante patrón externo entre 0 y 50 mM (ver Apéndices 8.6).

Las condiciones de análisis son las siguientes:

Instrumentación:

- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890.
- Detector de ionización de llama.
- Integración Millennium 2.15.10

Condiciones cromatográficas:

- Columna: 25% NPAG + 2% H₃PO₄ WAW 100/200, de 2,7 m x 1/8", de Supelco.
- Portador: Nitrógeno.
- Presión de retroceso: 290 KPa.
- Inyección: 0.5 µl.
- Tiempo de análisis: 14 minutos.
- Temperatura horno: isoterma a 145 °C.
- Temperatura inyector: 250 °C.
- Temperatura detector: 260 °C.

La columna debe permanecer saturada con ácido fórmico para evitar el efecto memoria.

Preparación de las muestras:

Las muestras a analizar deben estar filtradas por una membrana de 0.45 µm. La inyección se realiza directa sin diluciones.

3.2.2.2. Análisis de propionato de n-butilo por Cromatografía de Gases

Este método permite la determinación de propionato de n-butilo en disolventes orgánicos. La cuantificación se realiza mediante patrón externo de 6 niveles, desde 0 hasta 100 mM (ver Apéndices 8.7).

Instrumentación:

- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890.
- Inyector automático Hewlett Packard 7673 A.
- Detector de ionización de llama.
- Integración Millennium 2.15.01.

Condiciones cromatográficas:

- Columna: HP-INNOWax (Crosslinked Polyethylene Glycol) 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm .
- Portador: He.
- Inyección: 1 μl , split 50:1.
- Tiempo de análisis: 10 minutos.
- Temperatura horno: isoterma 40 °C.
- Temperatura inyector: 250 °C.
- Temperatura detector: 275 °C.
- Presión de retroceso: 24 psi.
- Flujo purga del septum: 4.9 ml/min.
- Flujo división con venteo: 52 ml/min.

Preparación de las muestras:

Las muestras a analizar deben estar filtradas por una membrana de 0.45 μm . La inyección se realiza directa sin diluciones.

3.2.2.3. Análisis de hexanol por Cromatografía de Gases

Este método permite la determinación de hexanol en disolventes orgánicos. La **cuantificación** se realiza mediante patrón externo de 6 niveles, desde 0 hasta 100 mM (ver Apéndices 8.8).

Instrumentación:

- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890.
- Inyector automático Hewlett Packard 7673 A.
- Detector de ionización de llama.
- Integración Millennium 2.15.01.

Condiciones cromatográficas:

- Columna: HP-INNOWax (Crosslinked Polyethylene Glycol) 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm f.
- Portador: He.
- Inyección: 1 μl , split 50:1.
- Tiempo de análisis: 10 minutos.
- Temperatura horno: isoterma 40 °C.
- Temperatura inyector: 250 °C.
- Temperatura detector: 275 °C.
- Presión de retroceso: 24 psi.
- Flujo purga del septum: 4.9 ml/min.
- Flujo división con venteo: 52 ml/min.

Preparación de las muestras:

Las muestras a analizar deben estar filtradas por una membrana de 0.45 μm . La inyección se realiza directa sin diluciones.

3.2.2.4. Análisis de butanol por HPLC

Este método permite la determinación de butanol en medio acuoso. La **cuantificación** se realiza mediante patrón externo de 8 niveles, desde 0 hasta 5 g/l (ver Apéndices 8.9).

Instrumentación:

- HPLC Hewlett Packard 1050.
- Detector de índice de refracción Hewlett Packard 1047A
- Integración Millennium 2.15.01.

Eluyente:

Como fase móvil se utiliza ácido sulfúrico 0.015 M disuelto en agua MilliQ (resistencia 18.2Ω) a pH=3.0. El eluyente es filtrado a través de 0.45 μm y **desgasificado** mediante vacío.

Condiciones cromatográficas:

- Columna: Aminex HPX-87H de Biorad.
- Caudal: isocrático 0.6 ml/min.
- Inyección: 15 μl ,
- Tiempo de análisis: 30 minutos.
- Temperatura: 65 °C.

Preparación de las muestras:

Las muestras a analizar deben estar filtradas por una membrana de 0.45 μm . La inyección se realiza directa sin diluciones.

3.2.2.5. Análisis de enantiómeros de ibuprofeno por HPLC

Este método permite la determinación del exceso enantiomérico de una mezcla de enantiómeros R y S de ibuprofeno (ver Apéndices 8.10) en medio orgánico.

Instrumentación:

- Cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard 1090.
- Detector DAD a 226 nm.

Eluyente:

Como fase móvil se utiliza Hexano, Isopropanol, Ácido trifluoroacético (1000:10:1).

Condiciones cromatográficas:

- Columna: fase normal Chiracel OD, de Daicel Chemical Industries LTD.
- Caudal: isocrático de 1.0 ml por minuto.
- Volumen de inyección: 5 μ l.
- Tiempo de análisis: 20 minutos.
- Temperatura: Ambiente.

Preparación de las muestras:

Las muestras que se desean analizar deben estar previamente filtradas por una membrana de 0.45 μ m. La inyección se realiza directa sin diluciones.

3.2.2.6. Análisis de enantiómeros del ácido 2-fenil-propiónico por HPLC

Este método permite la determinación del exceso enantiomérico de una mezcla de enantiómeros R y S del ácido 2-fenil-propiónico (ver Apéndices 8.11) en medio orgánico.

Instrumentación:

- Cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard 1090.
- Detector DAD a 220 nm.

Eluyente:

Como fase móvil se utiliza Hexano, Isopropanol, Ácido trifluoroacético (1000:10:1).

Condiciones cromatográficas:

- Columna: fase normal Chiracel OD, de Daicel Chemical Industries LTD.
- Caudal: isocrático de 1.0 ml por minuto.
- Volumen de inyección: 5 μ l.
- Tiempo de análisis: 15 minutos.
- Temperatura: Ambiente.

Preparación de las muestras:

Las muestras que se desean analizar deben estar previamente filtradas por una membrana de 0.45 μ m. La inyección se realiza directa sin diluciones.

3.2.2.7. Análisis de enantiómeros del *trans*-2-fenil-1-ciclohexanol por HPLC

Este método permite la determinación del exceso enantiomérico de una mezcla de enantiómeros (1R,2S) y (2R,1S) del *trans*-2-fenil-1-ciclohexanol (ver Apéndices 8.12) en medio orgánico.

Instrumentación:

- Cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard 1090.
- Detector DAD a 215 nm.

Eluyente:

Como fase móvil se utiliza Hexano, Isopropanol (100:2).

Condiciones cromatográficas:

- Columna: fase normal Chiracel OD, de Daicel Chemical Industries LTD.
- Caudal: isocrático de 1.0 ml por minuto.
- Volumen de inyección: 10 μ l.
- Tiempo de análisis: 15 minutos.
- Temperatura: Ambiente.

Preparación de las muestras:

Las muestras que se desean analizar deben estar previamente filtradas por una membrana de 0.45 μ m. La inyección se realiza directa sin diluciones.

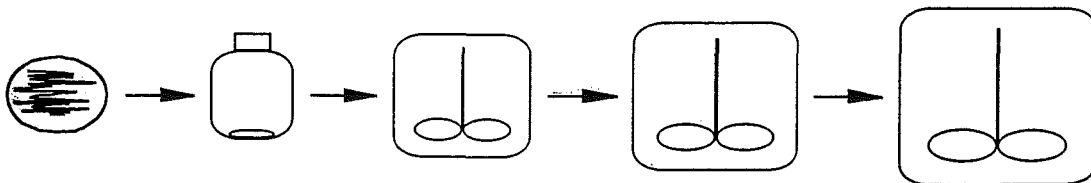
4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. PRODUCCIÓN DE LA LIPASA UAB

4.1.1. Estrategia de fermentación

Las lipasas UAB de *Candida rugosa* se producen mediante fermentación en fed-batch siguiendo el siguiente sistema: se realizaron inóculos sucesivos hasta llegar al fermentador Braun Biostat UD de 50 l de volumen de trabajo. Dichos inóculos se llevaron a cabo en discontinuo mientras que en el fermentador de producción al proceso discontinuo siguió una operación fed-batch de caudal de adición constante de ácido oleico. La elección de esta estrategia demostró ser la óptima desde el punto de vista de simplicidad operacional y de producción de lipasas cuando se compara con operaciones en discontinuo y continuo (Gordillo, 1996). En todos los casos el ácido oleico fue utilizado como fuente de carbono y como inductor para la producción de la enzima puesto que estudios previos habían demostrado que era el mejor de los substratos probados (Obradors *et al.*, 1993).

En la Figura 4.1.1 se presenta un seguimiento de los puntos de operación claves del proceso, mientras que en la Figura 4.1.2 se presenta la evolución de los parámetros claves de la fermentación, biomasa (X) y actividad lipolítica (L) durante un proceso fed-batch en planta piloto. También se presentan las concentraciones iniciales de ácido oleico (S).



Placa Petri	Pre-inóculo Botellas (50 ml)	Braun Biolab (0.5 l)Discontinuo	Braun Biostat ED (5 l) Discontinuo	Braun Biostat UD (50 l) Discontinuo
	$S_0=2 \text{ g/l}$	$S_0=4 \text{ g/l}$ $X_f=4.1 \text{ g/l}$ $L_f=2.8 \text{ U/ml}$	$S_0=4 \text{ g/l}$ $X_f=3.6 \text{ g/l}$ $L_f=15.7 \text{ U/ml}$	$S_0=2 \text{ g/l}$ $X_f=2.6 \text{ g/l}$ $L_f=10.5 \text{ U/ml}$
				Fed-batch
				$q=0.2 \text{ g/(h}\cdot\text{l ferm.)}$ $X_f=6.3 \text{ g/l}$ $L_f=143.4 \text{ U/ml}$

Fig. 4.1.1.: Evolución de los parámetros claves de fermentación en el sistema de inóculos para la producción en planta piloto de lipasas por *Candida rugosa*.

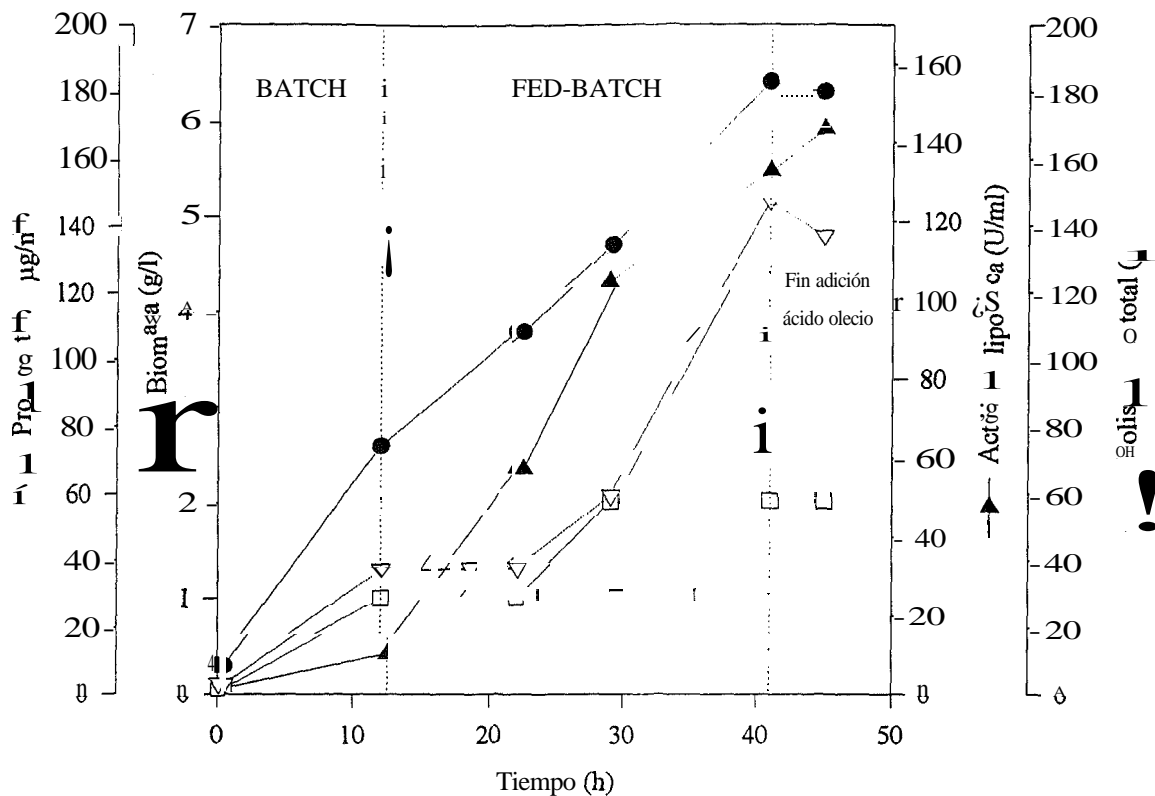


Fig. 4.1.2.: Seguimiento de un fed-batch de producción de lipasas por *Candida rugosa* en Biostat UD ($q=0.2 \text{ g}/(\text{h}\cdot\text{l ferm})$).

Los valores obtenidos para esta estrategia de operación suponen una elevada productividad comparando con experimentos en discontinuo tanto en términos de actividad lipolítica/g de biomasa como en el caso de actividad lipolítica/(volumen de fermentador·tiempo), alcanzando los resultados de:

$22.7 \cdot 10^3 \text{ U}$ de actividad producidas en total/g de biomasa:

$4.04 \cdot 10^3 \text{ U}$ de actividad producidas en discontinuo/g de biomasa

$35.3 \cdot 10^3 \text{ U}$ de actividad producidas en fed-batch/g de biomasa

$3.18 \cdot 10^3 \text{ U}$ de actividad producidas en total/(l fermentador·h de operación)

$0.88 \cdot 10^3 \text{ U}$ de actividad producidas en discontinuo/(O fermentador·h operación batch)

$4.02 \cdot 10^3 \text{ U}$ de actividad producidas en fed-batch/(l fermentador·h operación fed-batch)

También es importante destacar que la parada de la adición del ácido oleico se realiza en un momento en el cual todavía no se ha detenido la producción y el crecimiento de la biomasa es prácticamente lineal, lo que indica que dicho crecimiento del microorganismo todavía no se encuentra limitado por la escasez o falta de sustrato. El motivo de detener en este punto la fermentación es el de evitar la aparición en concentraciones elevadas de productos finales como polisacáridos u otras proteínas que suelen producirse en fases avanzadas del crecimiento cuando empieza a haber limitación de sustrato. Estos compuestos interfieren fuertemente en la separación, purificación y utilización posterior de las lipasas, por lo que se prefirió detener la fermentación en un momento en el cual todavía no eran importantes. En particular, es notable la interferencia que tienen los polisacáridos en operaciones de cromatografía y filtración, como se comentará en el apartado 4.3.

4.1.2. Determinación de la ley de adsorción de las lipasas sobre el ácido oleico

Un fenómeno importante que tiene lugar en la producción de lipasas por *Candida rugosa*, cuando crece utilizando ácido oleico como sustrato, es la adsorción de la enzima sobre la interfase orgánico-acuosa formada debido a la inmiscibilidad del ácido oleico en la fase acuosa mayoritaria. El hecho de que enzimas lipolíticos tengan tendencia a adsorberse a la interfase orgánico-acuosa está ampliamente referenciado (Börgstrom y Brockman, 1984) y provoca que la enzima producida por el microorganismo se encuentre repartida entre la fase acuosa y la fase orgánica. Los análisis de actividad lipolítica se realizan sobre muestras filtradas y libres de biomasa y de ácido oleico con lo que la medida sólo refleja la cantidad de enzima presente en la fase acuosa.

De cara a mejorar el modelo matemático de producción de la lipasa incluyendo este fenómeno, se desarrolló un sistema para describir la ley física de adsorción de las lipasas sobre el ácido oleico. En este sistema se iban añadiendo al fermentador cantidades variables de ácido oleico. El fermentador contenía el medio habitual de fermentación estéril y una cantidad conocida de lipasa de *Candida rugosa*, observándose la disminución de la actividad lipolítica al producirse el fenómeno de adsorción. El fermentador utilizado fue un Braun Biostat E de 5 l de capacidad cuya geometría es similar a los utilizados en el proceso de

fermentación ya que estudios anteriores de este fenómeno en botellas agitadas demostraron una fuerte dependencia de este fenómeno con las propiedades reológicas del sistema básicamente por lo que se refiere a agitación y aireación (Gordillo, 1996).

La ley de Langmuir ha sido ampliamente empleada para la descripción de sistemas de este tipo (Malcata *et al.*, 1992; Gitlesen *et al.*, 1997). Dicha ley para nuestro sistema tendría la siguiente expresión:

$$\frac{Lip_{org}}{A} = \frac{\kappa \cdot Lip_{aq}}{1 + K_3 \cdot Lip_{aq}} \quad (1)$$

donde Lip_{org} sería la concentración de soluto (actividad enzimática) adsorbido en la interfase, A sería el equivalente a la concentración de adsorbente, en nuestro caso el área interfacial generada por la emulsión de ácido oleico, y Lip_{aq} sería la concentración de soluto en la fase acuosa no adsorbida, valor que se puede determinar analíticamente. Como primera aproximación se realizó una simplificación de la ecuación (1), considerando que el soluto adsorbido era sólo proporcional a la concentración de soluto no adsorbido, es decir, despreciando K_3 :

$$\frac{Lip_{org}}{A} = K \cdot Lip_{aq} \quad (2)$$

La expresión del área interfacial para unas condiciones de trabajo y para unos valores constantes de densidad, viscosidad y tensión interfacial que se mantienen para cada tipo de substrato viene dada por:

$$A = \frac{K' \cdot S}{K'_d + S} \quad (3)$$

El balance de actividad lipolítica viene dado por:

$$Lip_{tot} = Lip_{aq} + Lip_{org} \quad (4)$$

Substituyendo (3) en (2) y teniendo en cuenta (4):

$$\frac{Lip_{aq}}{Lip_{tot}} = \frac{1}{1 + \frac{K_d \cdot S}{K'_d + S}} \quad (5)$$

Para la determinación de las constantes K_d y K'_d se realizaron tres experimentos a diferentes actividades lipolíticas iniciales en las que se iba añadiendo ácido oleico y se observaba la evolución del cociente Lip_{aq}/Lip_{tot} . En la Figura 4.1.3. se representan los datos experimentales obtenidos, y en la Tabla 4.1.1 se recogen los datos ajustados para la obtención de K_d y K'_d .

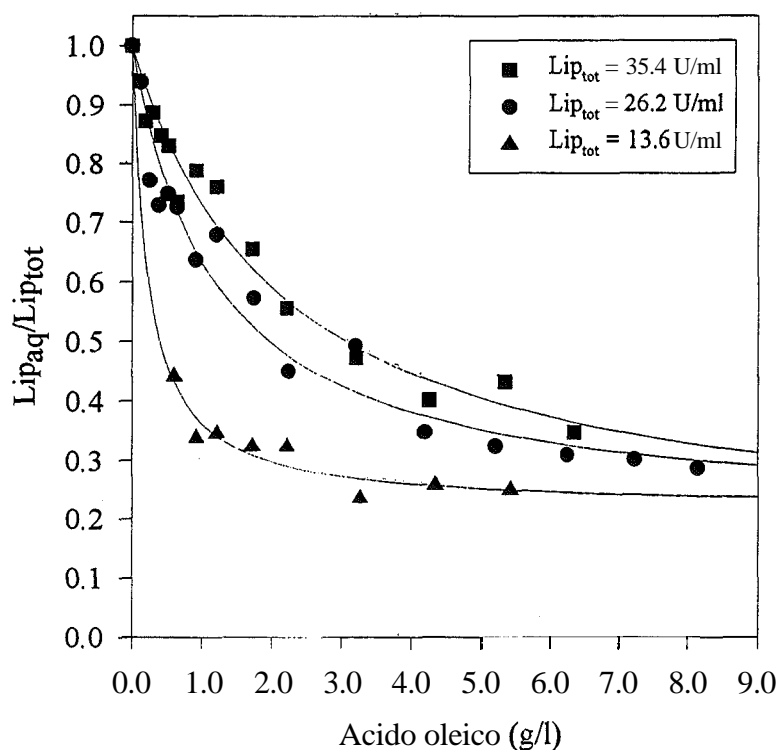


Fig. 4.1.3.: Comportamiento de la ley de adsorción simplificada para distintos valores de la actividad lipolítica total inicial.

Lip_{tot} (U/ml)	K_d	K'_d
35.4	6 ± 3	14 ± 8
26.2	4 ± 1	6 ± 2
13.6	3.6 ± 0.4	1.0 ± 0.3

Tabla 4.1.1.: Valores de K_d y K'_d obtenidos mediante el ajuste de los valores de la Fig. 4.1.3.

Si la ecuación (5) describiese correctamente el fenómeno, los valores de K_d y K'_d tendrían que ser iguales para cualquier valor de Lip_{tot} y el cociente Lip_{aq}/Lip_{tot} tendría que ser constante si se mantiene constante la concentración de ácido oleico. La figura 4.1.4 recoge un experimento en el que se varió la actividad lipolítica total manteniendo constante la concentración de ácido oleico. En ella se observa como la relación Lip_{aq}/Lip_{tot} varía con la actividad lipolítica introducida en el fermentador para una concentración de ácido oleico constante (0.5 g/l).

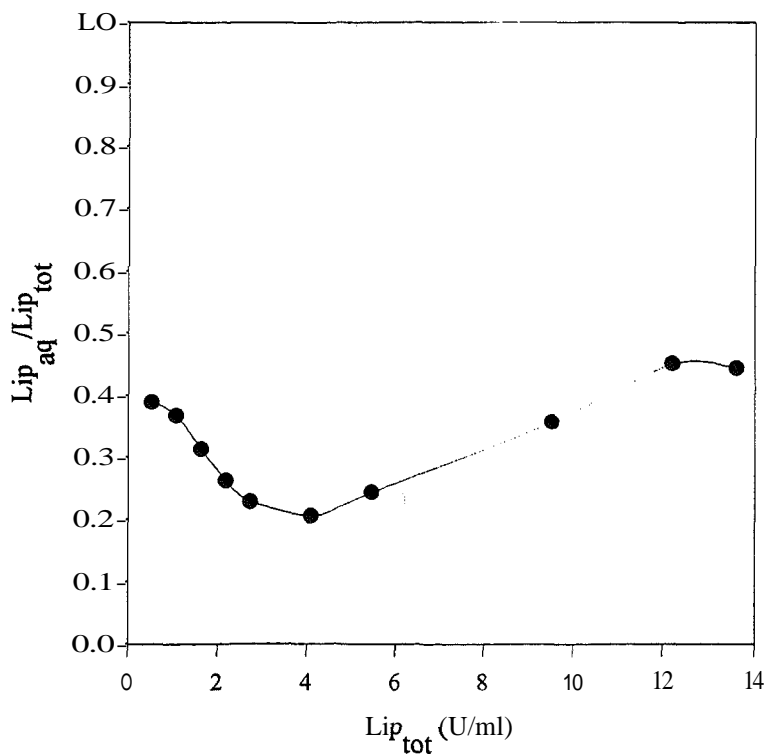


Fig. 4.1.4.: Evolución del cociente Lip_{aq}/Lip_{tot} para una concentración constante de ácido oleico de 0.5 g/l.

Así pues, parece claro que la simplificación considerada en la ecuación (5) no es representativa del sistema, y que el porcentaje de adsorción representado por el cociente Lip_{aq}/Lip_{tot} varía sensiblemente con la concentración de enzima total del medio, es decir, que la lipasa influye de forma clara en su propia adsorción, posiblemente debido a un efecto de estabilización de la emulsión de ácido oleico (Kierkels *et al.*, 1994).

Ante este comportamiento se pasó a considerar la ecuación de Langmuir completa. A partir de la ecuación (1) y usando las mismas estrategias que para obtener la ecuación (5) se obtiene la ecuación (6):

$$\frac{Lip_{aq}}{Lip_{tot}} = \frac{1}{1 + \frac{K_1 \cdot S}{K'_d + S} \frac{1}{1 + K_3 \cdot Lip_{aq}}} \quad (6)$$

Esta ecuación representa la ley de Langmuir completa para este sistema. Hay que señalar que en esta ecuación, el porcentaje de lipasa adsorbida depende de dos variables: la concentración de ácido oleico y la concentración de lipasa total, tal y como se deduce de los valores variables de las constantes de la tabla 4.1.1. Por consiguiente, las gráficas que representarán los perfiles de adsorción serán tridimensionales. En la Figura 4.1.5 se muestra la representación de los puntos experimentales así como la superficie de ajuste de dichos puntos mediante la ecuación (6). En la gráfica queda manifiesta la dependencia de la ley de adsorción de la concentración de ácido oleico y de la lipasa acuosa.

El ajuste de los valores experimentales a la ecuación (6) generó tres nuevos parámetros, K_1 , K_3 y K'_d , que serán los que definan la ley de adsorción para este sistema y cuyos valores fueron los siguientes:

$$K_1 = 8.0 \pm 1.0$$

$$K_3 = 0.28 \pm 0.05 \text{ ml/U}$$

$$K'_d = 1.1 \pm 0.1 \text{ g/l}$$

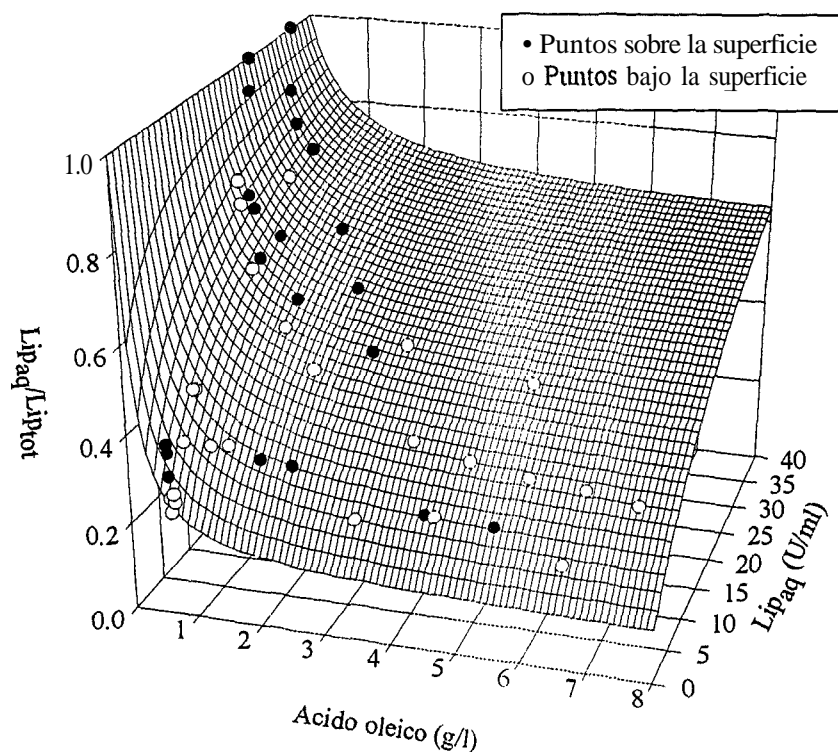


Fig. 4.1.5.: Representación de los puntos experimentales y ajuste de los mismos mediante la ecuación (6) que representa la ecuación de adsorción de Langmuir completa para este sistema.

La bondad del ajuste se refleja claramente en la importante disminución del error de ajuste de los parámetros con respecto a los determinados mediante la ecuación simplificada, situándose en valores inferiores al 20% para todos los casos. Por tanto, parece claro que una ecuación de Langmuir completa describe el sistema de una manera satisfactoria y que estos parámetros pueden ser introducidos en el modelo matemático de descripción del proceso.

Es conocido el hecho de que las enzimas o las proteínas en general tienden a generar fenómenos de adsorción en multicapa (Lee y Park, 1996). Se llega a un punto de saturación a partir del cual las proteínas se siguen adsorbiendo sobre si mismas, una vez ocupados todos los puntos de adsorción sobre el soluto. En nuestro caso, este fenómeno se tendría que traducir en que el sistema respondiera mejor a un ajuste del tipo multicapa como describe la ecuación (7) propuesta por Brunauer *et al*, (1938) y conocida como ley de B.E.T.

$$\frac{Lip_{org}}{A} = \frac{K \cdot Lip_{aq}}{(Lip_s - Lip_{aq}) \left[1 + (K_4 - 1) \cdot \frac{Lip_{aq}}{Lip_s} \right]} \quad \text{Ley de B.E.T. (7)}$$

donde Lip_s representa el valor de saturación a partir del cual se produce el fenómeno multicapa. Sin embargo, en el sistema estudiado, y para el rango de actividades lipolíticas y concentraciones de ácido oleico estudiadas, no se observó dicho comportamiento como se observa en la Figura 4.1.6. En dicha figura se representa en líneas discontinuas el comportamiento teórico típico para un fenómeno multicapa descrito por la ley de BET.

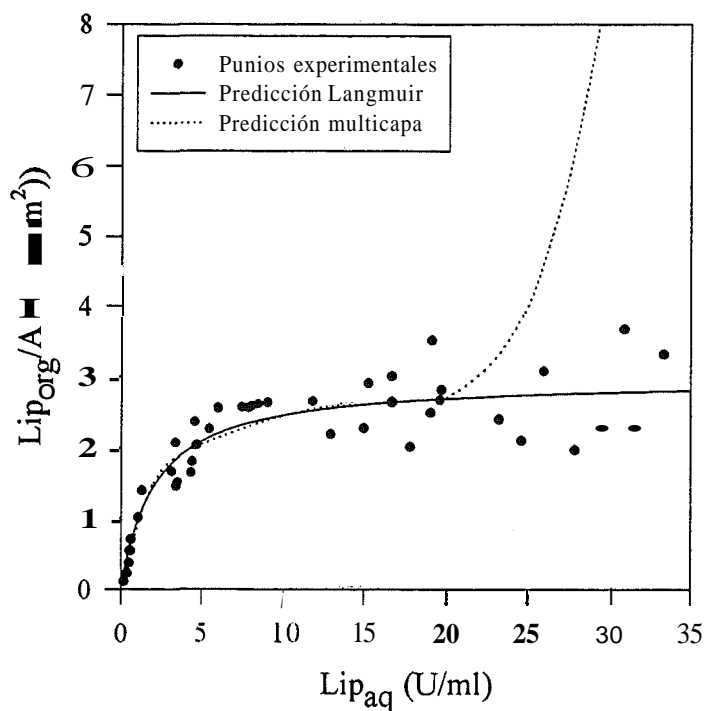


Fig. 4.1.6.: Predicción de ley de adsorción con fenómeno multicapa con respecto a ley de Langmuir y comparación con los puntos experimentales.

Otra comprobación realizada fue determinar la influencia que podía tener la propia biomasa en la adsorción. Dada la naturaleza lipídica de la membrana celular, podría producirse el fenómeno de adsorción de la enzima sobre las propias células. Para ello, se hizo crecer *Candida rugosa* sobre galactosa, substrato en el que la producción de lipasa es mínima, recuperándose la biomasa por centrifugación. La biomasa centrifugada se resuspendió en medio de cultivo sin fuente de carbono de manera que se obtuvieron concentraciones variables de biomasa. Para cada una de estas concentraciones se añadió una solución de actividad lipolítica conocida, analizándose la actividad remanente en la solución acuosa. Los resultados se presentan en la figura 4.1.7.

Como se observa en dicha figura el fenómeno de la adsorción de la lipasa sobre la biomasa tiene lugar en el sistema pero con valores no superiores al 15 %. La adsorción de la lipasas en la **interfase** biomasa-acuosa es mucho menor que en la **interfase** orgánico-acuosa formada por el ácido oleico, en la que el % de adsorción llegaba a alcanzar el 60 %. Debido a estas marcadas diferencias no se consideró este efecto en la expresión final de la ley de adsorción.

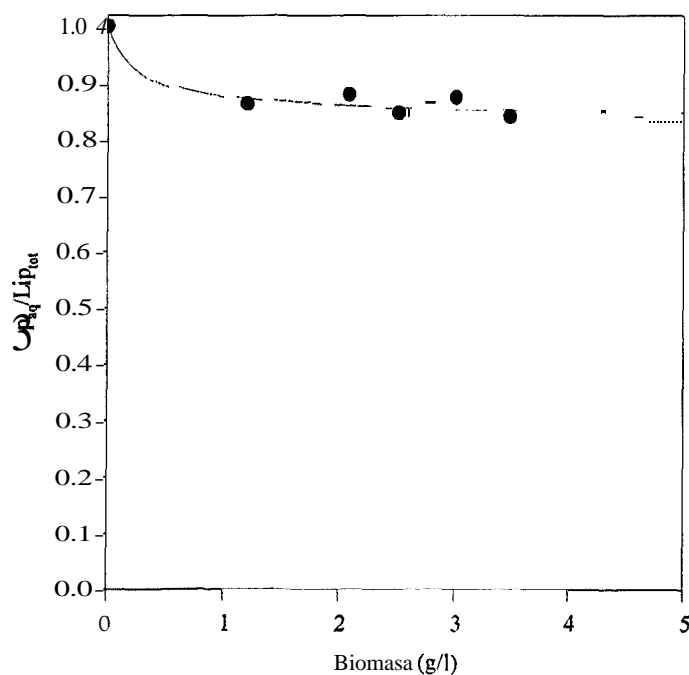


Fig. 4.1.7.: Adsorción de la lipasa sobre las células de *Candida rugosa* en ausencia de ácido oleico para distintas concentraciones de biomasa.

En consecuencia se eligió la ecuación (6) con los parámetros determinados anteriormente, para describir la adsorción de las lipasas de *Candida rugosa* sobre ácido oleico. La ley tendría la siguiente expresión:

$$\frac{Lip_{oa}}{Lip_{tot}} = \frac{1}{1 + \frac{S'S}{(1.1+S)(1+0.28 \cdot Lip_{oa})}} \quad (8)$$

La ecuación (8) fue validada eliminando del ajuste experimentos completos de distintos valores de la Lip_{tot} (los correspondientes a las figuras 4.1.3 y 4.1.4). Al realizar esta operación se observó que los cambios en los parámetros eran mínimos, así como el error relativo medio de estimación (MRE). La variación de estos parámetros se recoge en la tabla 4.1.2 y fue marcadamente menor que en el caso de usar una ley de adsorción lineal (Tabla 4.1.1).

Puntos considerados	K_1	K'_d (g/l)	K_3 (ml/U)	M.R.E.
Todos (48)	8.0 ± 1.0	1.1 ± 0.1	0.28 ± 0.05	0.11
Todos excepto $Lip_{tot}=35.4$ U/ml (35)	9.0 ± 1.0	1.2 ± 0.1	0.29 ± 0.05	0.11
Todos excepto $Lip_{tot}=26.2$ U/ml (32)	8.0 ± 1.0	1.0 ± 0.1	0.28 ± 0.05	0.10
Todos excepto $Lip_{tot}=13.6$ U/ml (40)	8.0 ± 1.0	1.1 ± 0.1	0.25 ± 0.05	0.13

Tabla 4.1.2.: Variación de las constantes de la ecuación (8) y del error medio relativo de ajuste (MRE) al eliminar experimentos completos de una actividad lipolítica determinada.

Como conclusión, la ley de adsorción completa descrita por la ecuación (8) se incluyó en el modelo matemático del proceso para conocer la actividad lipolítica total **extracelular** presente en el medio (acuosa + adsorbida). Esta ley está validada para las actividades lipolíticas y concentraciones de ácido oleico habituales presentes en las fermentaciones en **fed-batch**. El conocimiento de este valor permitirá, por ejemplo, poder realizar balances de actividad lipolítica total extracelular.

4.1.3. Conclusiones

Como conclusiones a este apartado se pueden destacar:

- Se ha diseñado un sistema de producción de lipasas mediante operación en fed-batch a escala planta piloto (50 l).
- Se ha determinado la productividad del sistema de fermentación empleado, resultando superior a los sistemas en discontinuo y continuo utilizados anteriormente.
- Esta lipasa se denominará lipasa **UAB**.
- Se ha determinado la expresión de la ley de adsorción de **Langmuir** de la lipasa UAB sobre ácido oleico bajo las condiciones de operación, permitiendo su inclusión en el modelo matemático que describe la producción de las lipasas UAB de *Candida rugosa*.

4.2. SEPARACIÓN DE LA LIPASA UAB

4.2.1. Obtención de un concentrado líquido de lipasas UAB

La lipasa producida por *Candida rugosa* es una enzima **extracelular**, si bien y dependiendo de las condiciones de operación puede encontrarse **mayoritariamente** en el interior de la célula (Gordillo, 1996). En este trabajo sólo se hará referencia a la purificación y recuperación de la enzima extracelular.

La operación en fed-batch a baja velocidad de adición constante de ácido **oleico** ($q=0.2$ g ácido **oleico**/(h·l de fermentador)) ha resultado ser la más productiva en términos de actividad lipolítica total presente en el medio de cultivo. Esta actividad **enzimática** se cifra en torno a las 100-150 U/ml, siendo la concentración de proteína total correspondiente entre 60-100 µg/ml y la biomasa final presente en un rango de 6-8 g/l. Electroforesis de este caldo de cultivo permiten estimar entre un 20 y un 30% el contenido en lipasa en referencia a la proteína total (Gordillo *et al.*, 1995).

El diseño de las diferentes etapas para la separación de la lipasa UAB extracelular del medio **de** cultivo se representa en la Figura 4.2.1. Este proceso consta de una centrifugación previa a 3000g (Westfalia Separator AG), en la que se elimina la mayoría de la biomasa del medio, seguido de una **microfiltración** por 0.45µm (Minitan® Millipore) con objeto asegurar la total eliminación de la biomasa. Este líquido clarificado se esterilizó químicamente mediante la adición **de azida** sódica (0.02%), la adición de la misma no supone ninguna pérdida de actividad por parte de la enzima. Teniendo en cuenta que la lipasa comercial de *Candida rugosa* (Sigma 1754 **tipo VII**) tiene un peso molecular aproximado de 60 kDa (Rúa *et al.*, 1993), resultado que se **confirma** por electroforesis en nuestras fermentaciones (Gordillo *et al.*, 1995), la siguiente etapa consistió en una **ultrafiltración** utilizando membranas de 10kDa de cut-off, en esta etapa se concentraba el volumen de fermentación 40 veces, este concentrado se diluía hasta su volumen inicial mediante la adición de tampon Tris-HCl 20 mM pH = 7.4, óptimo para la lipasa UAB (Gordillo *et al.*, 1995). Volviéndose a ultrafiltrar por 10kDa con una reducción del volumen de 40 veces obteniéndose el concentrado final de lipasas. En esta última **etapa**, similar a una

diafiltración, se conseguía la práctica eliminación de las sales del medio de fermentación así como la eliminación de la mayoría de proteína no lipolítica de peso molecular inferior a 10 kDa.

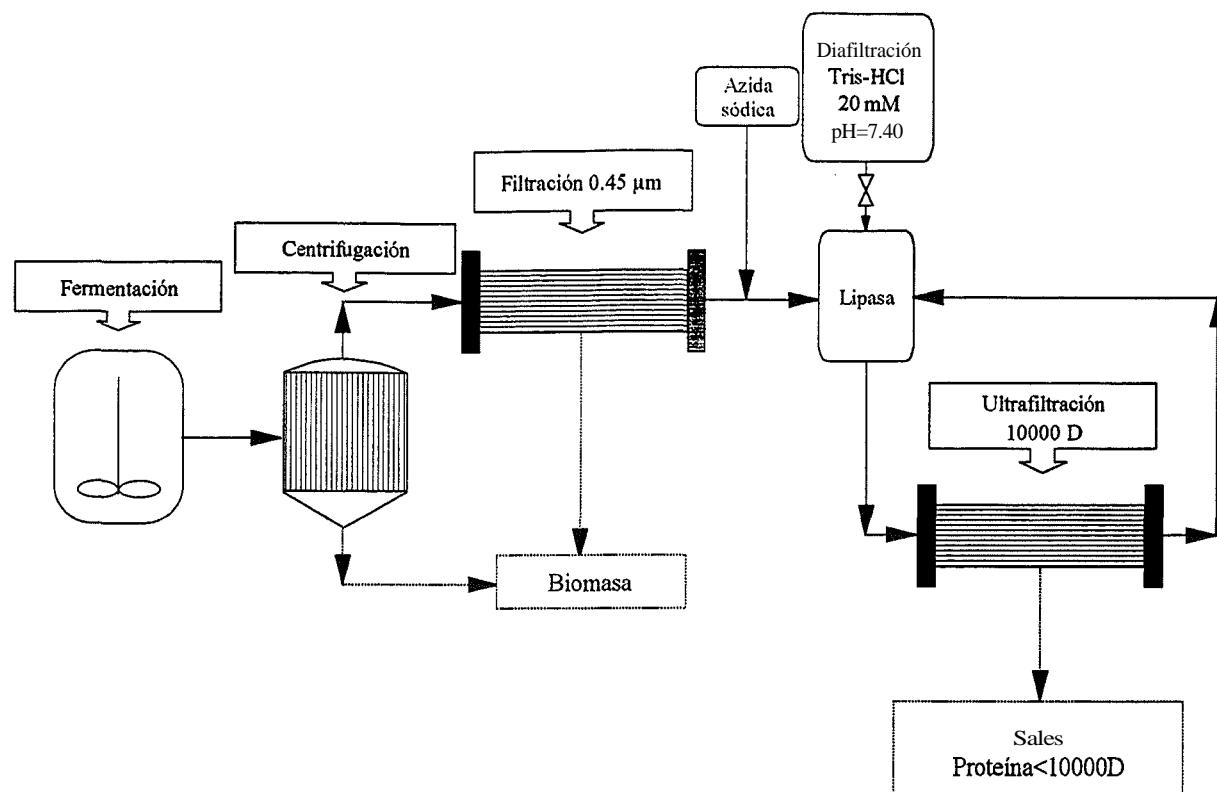


Fig. 4.2.1.: Separación de la lipasa UAB desde el caldo de fermentación hasta la obtención de un concentrado líquido dializado.

En la tabla 4.2.1 se presentan los rendimientos referentes a actividad lipolítica obtenidos en las diferentes etapas numeradas del proceso y la actividad lipolítica específica para un experimento en fed-batch estándar en un fermentador Braun Biostat E de 5 l de volumen. Los resultados obtenidos han sido corroborados con el uso de fermentadores de escala piloto como los Braun Biostat ED de 15 l o Braun Biostat UD de 50 l de volumen.

El punto crítico en el escalado del proceso de separación es, sin lugar a dudas, la etapa de **ultrafiltración**, para ello se trabajó con tres sistemas en función del volumen de que se tratara:

- Sistema **Minitan®** Millipore equipado con 4 membranas PMNL de 10 kDa de corte para volúmenes no superiores a 5 l.

- b) Sistema Prep/Scale TTF® Millipore con un PTGC 10 K 2.5 ft² Cartridge hasta 15 l de volumen.
- c) Sistema Centrasette® Pall Filtron con una membrana Omega 10K hasta 100 l de volumen.

En todos estos sistemas el corte elegido de 10 kDa aseguró la recuperación total de la actividad lipolítica como se puede observar en la Tabla 4.2.1.

Punto de proceso	Act. Lipolítica (U/ml)	Proteína total (µg/ml)	Vol. (l)	Act. Lipolítica espec. ffi/mg)	Rendimiento en act. lip. (%)
Final Fermentación	98	146	5.0	671	100
Caldo centrifugado	125	173	4.1	723	104.6
Filtración 0.45 µm	120	169	4.1	710	100.4
Primer retenido 10 kDa	3810	3547	0.128	1074	99.5
Primer filtrado 10 kDa	0	53	4.0	0	-
Redisolución en tampón	123	113	4.0	1088	100.4
Segundo retenido 10 kDa	5010	3270	0.100	1532	102.2
Segundo filtrado 10 kDa	0	27	3.900	0	-

Tabla 4.2.1. Balance de actividad lipolítica en los puntos del proceso de down-stream para la obtención de lipasas de *Candida rugosa*.

Al final del proceso de centrifugación se observa un aumento de aproximadamente un 5% en la actividad lipolítica probablemente debido a la liberación de la mayoría de la enzima que se encuentra adsorbida sobre la biomasa y que estudios previos habían estimado como máximo en un 15% del total (Capítulo 4.1). Por lo que respecta al balance de proteína total en la Figura 4.2.2 se recoge el mismo.

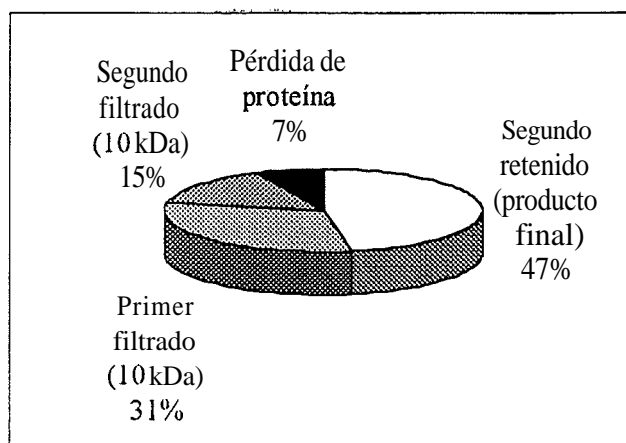


Fig. 4.2.2. Balance de proteína total en las dos operaciones de ultrafiltración a través de 10 kDa.

En dicha figura se observa que se ha eliminado en el filtrado aproximadamente un 47% de proteína total presente inicialmente en el caldo de cultivo de peso molecular inferior a 10 kDa, siendo la pérdida de proteína total aproximadamente del 7%. Esta pérdida se puede justificar en base a un posible fenómeno de adsorción sobre las placas de ultrafiltración, no obstante este es un problema que, en principio, no es preocupante ya que esta proteína adsorbida no tiene carácter lipolítico como lo demuestra el hecho de que no se observan pérdidas de actividad lipolítica al final del proceso.

A destacar que el balance de actividad lipolítica se cierra en el punto final con un valor del 100% lo que demuestra la gran estabilidad de la enzima, ya demostrada en anteriores trabajos (Gordillo *et al.*, 1995) y la validez del proceso diseñado.

4.2.2. Obtención de una lipasa UAB sólida

En este apartado se siguieron tres estrategias clásicas para la obtención de un sólido que contenga la lipasa con la menor pérdida posible de actividad lipolítica.

4.2.2.1. Precipitación con etanol

El uso de disolventes orgánicos para la precipitación de proteínas está ampliamente referenciado (Deutscher 1988). El etanol ha sido utilizado como agente precipitante con lipasas comerciales de *Candida rugosa* (Sigma tipo VII) obteniéndose resultados que van desde el 84% de recuperación de proteína y el 93% de actividad lipolítica (Veeraragavan y Gibbs, 1989), al 45% de recuperación de proteína y el 84% de actividad (Rúa *et al.*, 1993). Si bien no se tiene conocimiento de la precipitación de lipasas de *Candida rugosa* con disolventes orgánicos a partir del caldo de cultivo si existen referencias producidas por otros microorganismos. Así la lipasa producida por *Trichosporon fermentan WU-C12* se recuperó del caldo de cultivo mediante precipitación con acetona obteniéndose una recuperación de proteína del 14% y una recuperación de actividad lipolítica del 80% (Chen *et al.*, 1994).

Sin embargo, en el caso de la lipasa UAB producida bajo las condiciones de fermentación anteriormente comentadas, estos buenos resultados no se repitieron y se produjeron

importantes pérdidas de actividad lipolítica y de proteína total. En la Tabla 4.2.2. se presentan estos resultados para una precipitación típica.

Muestra	Actividad lipolítica (U/ml)	Volumen (ml)	Actividad lipolítica total (U)	Rendimiento (%)
Inicial	3500	22	77000	-
Pellet	1060	22	23320	30.3
Sobrenadante	47	43	2021	2.6

Tabla 4.2.2.: Recuperaciones de actividad lipolítica con etanol.

Para la determinación de los valores presentes en la tabla 4.2.2 y dada la interferencia del etanol en los análisis de proteína total y de actividad lipolítica, se eliminó el etanol de las muestras mediante evaporación en rotovapor y después se resuspendieron los sólidos en el mismo volumen de tampón. La lipasa es estable a estas operaciones, por tanto, las importantes pérdidas de actividad lipolítica reflejadas en la tabla 4.2.2 tenían que ser debidas al etanol, con lo que este sistema de recuperación no era el idóneo para la lipasa UAB.

4.2.2.2. Precipitación con sulfato amónico

El sulfato amónico es otro de los agentes precipitantes clásicos para proteínas (Harris y Angal, 1989). El sulfato amónico fue añadido en distintas proporciones con respecto al valor de saturación. La recuperación de actividad lipolítica y proteína total para dichos porcentajes de saturación se representa en la Figura 4.2.3. Las condiciones óptimas de separación se consiguieron para el 60 % de saturación en sulfato amónico, en el que se producía una recuperación superior al 70 % con respecto a la actividad lipolítica, y del 55% con respecto a la proteína. Estos resultados aun siendo mejor que los obtenidos con la precipitación con etanol se encuentran lejos de los obtenidos con lipasas de *Fusarium heterosporum*, del orden del 93% (Shimada *et al.*, 1993) pero mejores que los obtenidos con *Pseudomonas aeruginosa* IGB 83, del orden del 15% en cuanto a recuperación de la actividad lipolítica (Palmeros *et al.*, 1993).

En este sistema, la cantidad de sulfato amónico a añadir para conseguir una determinada proporción S_2 de sulfato amónico respecto al valor de saturación viene dada por la ecuación (1):

$$g = \frac{533(S_2 - S_1)}{100 - 0.3S_2} \quad (1)$$

en este caso $S_1=0$ y $S_2=60$, por lo que la concentración de sulfato amónico óptima para la precipitación de lipasas de *Candida rugosa* resulta ser de 390 g/l.

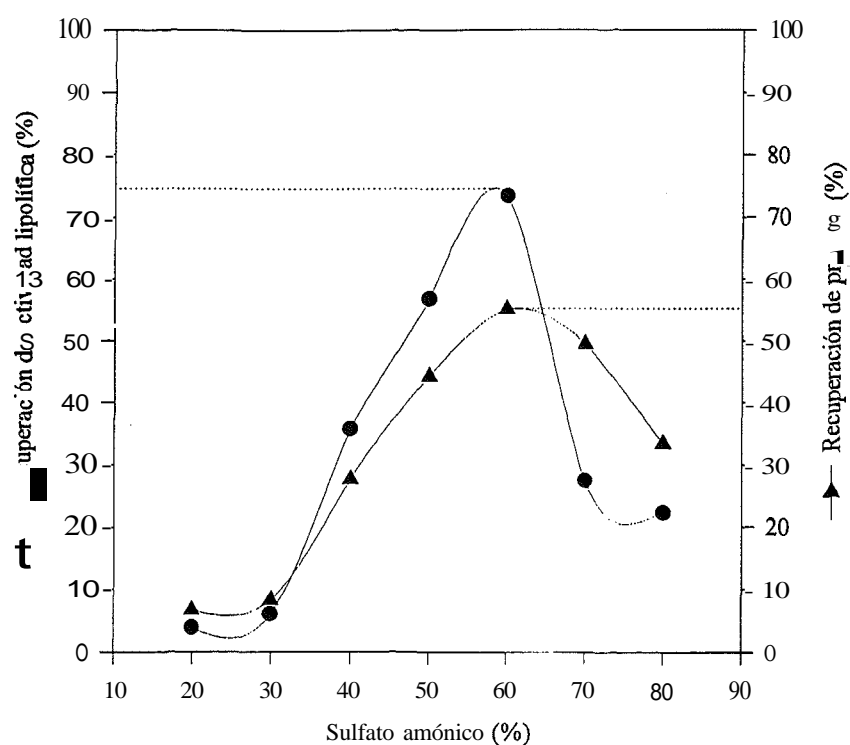


Fig. 4.2.3.: Recuperación de actividad lipolítica y proteína total en la precipitación con sulfato amónico.

En este caso, los valores de recuperación de actividad lipolítica ya eran parecidos a los descritos por Rúa *et al.* (1993) y este sistema podía ser una posibilidad para la recuperación óptima de la lipasa en forma de sólido.

4.2.2.3. Liofilización directa

Otra posibilidad de obtención de preparados sólidos de lipasas es una **liofilización** directa del concentrado líquido de lipasas. Este sistema se desarrolló congelando previamente el concentrado con una mezcla de nieve carbónica y acetona y posterior liofilización durante 24 horas. La liofilización directa del concentrado de caldo de cultivo, siguiendo el diseño anteriormente comentado, provocó una pérdida de actividad lipolítica próxima al 25%.

Es conocido que la adición de azúcares previos a la **liofilización** consigue una mayor estabilización de las proteínas en general (Monsan y Durand, 1971). De hecho en los preparados comerciales de lipasa de *Candida rugosa*, se detectan cantidades importantes de azúcares. Concretamente, en la lipasa comercial de Sigma el 70% del preparado comercial es lactosa. Ante este hecho se estudió la influencia que diversas concentraciones de lactosa añadidas al concentrado de lipasas pudiera tener con respecto a la pérdida de actividad lipolítica en el proceso de liofilización.

En la Figura 4.2.4 se observa como al variar la concentración de lactosa se produce un importante aumento de la recuperación de la actividad lipolítica en la liofilización. Sin embargo, para no generar una notable disminución de la actividad específica por aumento de la cantidad de sólido se eligió como óptimo el valor de 10 g/l de lactosa con el que se **obtenían** recuperaciones del 90 % de actividad. Como se observa en la figura 4.2.4, por encima de esta concentración el porcentaje de recuperación aumenta muy ligeramente, con lo que lo único que se conseguiría es una disminución de la actividad específica del **preparado sólido**. En este preparado **liofilizado** final, correspondiente a 10 g/l de lactosa, el % de lactosa final es del orden del 50% del sólido que se obtiene.

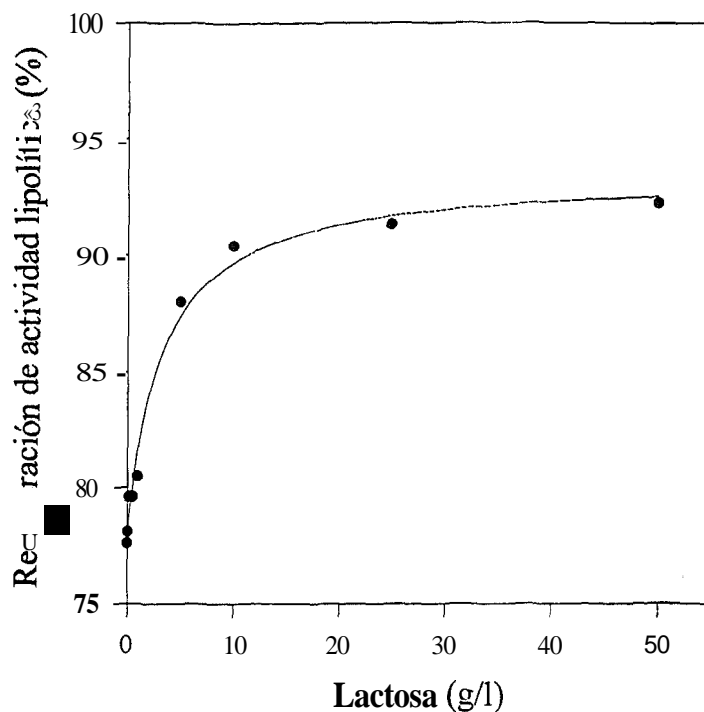


Fig. 4.2.4.: Recuperación de la actividad lipolítica en la liofilización en presencia de lactosa.

En la Tabla 4.2.3 se recogen, a modo de resumen, los resultados obtenidos con los tres sistemas en términos de recuperación. A la vista de los anteriores resultados y de la facilidad operacional de un sistema de liofilización se eligió este método para la obtención de lipasas en forma sólida a partir del concentrado líquido.

Método de obtención de lipasa en forma sólida	% recuperación de act. lipolítica	% recuperación de proteoma	Factor de purificación
Precipitación con etanol	~30	~27	1.11
Precipitación con sulfato amónico	~70	~55	1.27
Liofilización directa	~90	~100	0.90

Tabla 4.2.3.: Resumen de métodos de obtención de lipasa sólida de *Candida rugosa* a partir del concentrado líquido.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que los factores de purificación eran mejores en el caso de la precipitación con sulfato amónico, como se observa en la tabla 4.2.3, debido a que en el proceso de **liofilización** no hay eliminación de proteína total, mientras que en los procesos de precipitación siempre se produce un fenómeno de selectividad hacia alguna de las proteínas presentes.

Respecto a la liofilización cabe decir que la inclusión de lactosa en la liofilización, pese a tener un efecto **beneficioso** en la recuperación de actividad **lipolítica**, no se incorporó al protocolo general de separación, debido a que en muchos casos interesaba determinar el grado de glicosilación de las proteínas y la lactosa suponía una interferencia importante difícil de eliminar completamente, así pues, no fue incluida en la mayoría de los casos.

4.2.3. Conclusiones

Como resumen al capítulo, se llegó a las siguientes conclusiones:

- Se ha diseñado un sistema de downstream para la obtención de un concentrado líquido de **lipasa UAB** con recuperaciones de actividad cercanas al 100%.
- En este proceso se produce una disminución de la concentración de proteína del orden del 50%, correspondiendo a proteínas de peso molecular inferior a 10 kDa.
- Para conseguir un preparado sólido se probaron tres técnicas clásicas, precipitación con disolvente orgánico, con sulfato amónico y liofilización, siendo este último el que originó mejores resultados en recuperación de actividad (90%).
- La lactosa demostró ser un buen estabilizante para la lipasa UAB, aunque no se usó por generar interferencias en la caracterización de la lipasa UAB.

4.3. ESTIMACIÓN ECONÓMICA DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE LIPASAS UAB

4.3.1. Partidas que componen la estimación económica

Para determinar si este proceso era rentable económicamente de acuerdo con los precios actuales de la lipasa de *Candida rugosa*, se pasó a determinar las distintas partidas que corresponden a este tipo de estudios. En este estudio se consideró trabajar con un volumen de fermentación de 1 m³ al ritmo de 1 fermentación por semana y una vida media del proceso de 10 años.

4.3.1.1. Ventas (V)

El precio de la lipasa de *Candida rugosa* proporcionado por la empresa Amano, que lo comercializa a partir de 100 gramos, es de 375 ptas/g. Esta lipasa tiene una actividad específica entre 30-40 veces inferior a la producida en nuestro laboratorio en planta piloto, siendo su principal componente azúcares que se usan para su estabilización.

Con estos datos se puede estimar el precio obtenido con la producción propuesta, teniendo en cuenta que aproximadamente se producen 0.5 g producto/1 fermentador:

$$1 \text{ m}^3 \times 50 \text{ fermentaciones} \times 1000 \text{ l} \times 0.5 \text{ g/l} \times 375 \text{ ptas/g} \times 30 = 281.3 \text{ MM/año (V)}$$

4.3.1.2. Inmovilizado (I)

El precio de la partida maquinaria y equipos se puede calcular teniendo en cuenta los siguientes precios:

Equipos:

- Sistema de inoculación: 0.5 MM
- Braun Biostat ED 15 l: 14 MM
- Braun Biostat UD 1 m³: 35 MM

- Centrífuga en continuo 20 l/h: 5 MM
- Sistema **filtración/ultrafiltración** 1 m³: 1.5 MM
- Membranas filtración 0.45 µm: 6 x 0.15 MM = 0.9 MM
- Membranas **ultrafiltración** 10 kDa: 6 x 0.15 MM = 0.9 MM
- **Liofilizador** 14l/24 h: 1.7 MM

Analítica:

- pHstato = 0.8 MM
- Microscopio = 0.7 MM
- Espectrofotómetro = 0.5 MM

En total, Maquinaria y aparatos: X = 61.5 MM.

El precio de la partida de inmovilizado se calculará con el método de los porcentajes descrito por Vián (1991). En este método el valor del inmovilizado se divide en una serie de partidas que corresponden a porcentajes del valor de Maquinaria y aparatos.

- **Instalación:** entre 0.35X y 0.50X, para aparatos pequeños como es el caso se cogerá el valor mínimo, es decir: 0.35X = 21.5 MM.
- **Tuberías:** entre 0.10X y 0.60X que corresponden a sólidos y fluidos, en este caso, cogeremos un valor intermedio: 0.35X = 21.5 MM.
- **Instrumentación:** entre 0.05X y 0.30X, de donde se tomará el mínimo dado que los equipos comprados incorporan instrumentación: 0.05X = 3.1 MM.
- **Aislamiento:** entre 0.03X y 0.10X, el valor mínimo dado que no se tienen temperaturas elevadas en estos procesos: 0.03X = 1.8 MM.
- **Instalación eléctrica:** entre 0.10X y 0.20X, se tomará un valor intermedio, 0.15X = 9.2 MM.
- **Edificios:** entre 0.20X y 0.30X para instalaciones interiores, se tomará el valor intermedio 0.25X = 15.4 MM.
- **Servicios auxiliares:** entre 0.25X y 0.70X, el valor más bajo para este tipo de empresa que necesita pocos servicios tipo vapor o agua de refrigeración: 0.25X = 15.4 MM.

Con la suma de todas estas partidas se obtiene el **capital físico (Y)**:

$$Y = 87.9 \text{ MM}$$

El proyecto y dirección de obra se calcula como $0.20Y = 17.6 \text{ MM}$, sumando este valor al capital físico se obtiene el **capital directo (Z)**:

$$Z = 105.5 \text{ MM}$$

a los que se aplican los gastos de:

- **Contratista:** entre $0.04Z$ y $0.10Z$, se tomará el valor mínimo debido a la escasa complejidad de la planta: $0.04Z = 4.2 \text{ MM}$.
- **Imprevistos:** entre $0.10Z$ y $0.30Z$, se tomará el valor mínimo dada la experiencia que se tiene del proceso: $0.10Z = 10.6 \text{ MM}$.

Con ello se obtiene un valor final para la partida de **inmovilizado (I)** de **181.8 MM**.

Utilizando la regla de Lang descrita por Vián (1991) se puede obtener una estimación directa del capital inmovilizado a partir de la partida de maquinaria y aparatos:

$$I = \text{Coeficiente de Lang} \cdot \text{factor de corrección} \cdot X$$

Tomando los valores recomendados por Vián se obtiene:

$$I = 4.74 \times 0.6 \times 61.5 = 174.9 \text{ MM}$$

por tanto, en este caso es una muy buena aproximación.

4.3.1.3. Costes

El sistema de evaluación de los costes también se basa en un cálculo detallado de las partidas que los componen. Los costes se suelen dividir en dos grandes bloques, los denominados costes de fabricación (\hat{M}) que son los directamente asociados con la producción y los gastos generales (G) que no dependen de la producción.

Para este sistema:

a) Costes de fabricación (M):

- 1) **Materias primas (M1):** los reactivos necesarios y su precio de mercado se recogen en la tabla 4.3.1.

Compuesto	Precio unitario (ptas)	Cantidad(Kg/año)	Precio (ptas /año)
K_2HPO_4	71 145/50Kg	275	392000
KH_2PO_4	53528/50 Kg	750	803000
$MgSO_4$	8708/25 Kg	50	17000
$(NH_4)_2SO_4$	39353/50 Kg	200	157000
NH_3 30 %	27459/601	250 (l/año)	114000
Acido oleico	9380/4 l	400	4216000

Tabla 4.3.1.: Evaluación del coste de las materias primas para la producción de lipasa UAB.

Despreciando el precio del resto de reactivos (agua destilada, vitaminas, $FeCl_3$ y antiespumante) se obtiene un total de 5.7 MM/año.

- 2) **Mano de obra directa (M2):** considerando el elevado nivel de instrumentación de los equipos presentes, se puede estimar en 5 el número de personas necesarias para desarrollar el proceso. Considerando un valor medio de 4 MM/persona y año se tiene un valor de 20 MM.
- 3) **Patentes (M3):** entre 1 y 5 % de las ventas, en este caso, un valor medio del 3% originaría $M3 = 0.03V = 8.5$ MM.
- 4) **Mano de obra indirecta (M4):** entre 15 y 45 % del valor de la mano de obra directa, en este caso se toma el valor mínimo por el tipo de empresa: $M4 = 0.15M2 = 3$ MM.
- 5) **Servicios generales (M5):** esta partida será muy baja en nuestro caso, y sólo habría que tener en cuenta el vapor necesario en la esterilización. Se despreció en relación con el resto de términos.