

## Uso de Enzimas en Solventes Orgánicos en la Industria de Bioprocesos

Claudia Maytorena-Verdugo y Fernando García-Carreño\*

*Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Mar Bermejo 195. La Paz, BCS, México.*

Tel. Fax: +52 612 123 84 01.

E-mail: [fgarcia@cibnor.mx](mailto:fgarcia@cibnor.mx)

### RESUMEN

En este trabajo se hace un recuento de los tipos de sistemas industriales en donde intervienen enzimas. Estos sistemas pueden ser medios acuosos los cuales se dividen en: a) Agua + solvente miscible en agua, b) Agua + solvente inmiscible en agua, y c) medios anhidros. Se presentan ventajas y desventajas de usar solventes en procesos que tienen como catalizadores a enzimas. Se aborda el papel del agua en estos sistemas y el de los solventes y su efecto en la actividad de las enzimas. También se hace un listado de las enzimas usadas en estos sistemas y algunas características, enfocándose principalmente a lipasas.

**Palabras clave:** Bioprocesos, enzimas, medios no acuosos

### ABSTRACT

This work emphasizes industrial process based on enzymes as catalyst in non-aqueous media. These systems are classified as water-water miscible solvents, water-water immiscible solvents and anhydrous medium. Advantages and disadvantages are discussed, also the role of water and solvents in the enzyme activity. A list of enzymes used in the industry with their characteristics is presented focusing on lipases and examples of companies that use enzymes and organic solvents.

**Keywords:** Bioprocess, enzymes, non-aqueous media.

### INTRODUCCIÓN

La creciente necesidad de enzimas resistentes a las condiciones de trabajo de algunos procesos industriales hace indispensable la búsqueda de enzimas resistentes a altas temperaturas por largos periodos de tiempo. Algunos solventes orgánicos han sido usados en diferentes campos de la biotecnología como complemento en procesos en donde intervienen células y enzimas, sin embargo

al estar en contacto las células con los solventes orgánicos, es posible que se dé un efecto negativo en la célula (toxicidad) o en la enzima (desnaturalización) (Yeom & Daugulis, 1999). El objetivo de este trabajo es mostrar un nuevo panorama sobre el uso de enzimas en medios no acuosos, tipos de medios no acuosos, sus ventajas y desventajas y explicar el efecto de algunos solventes orgánicos en enzimas hidrolíticas.

## USO DE ENZIMAS EN LA INDUSTRIA

Los procesos biocatalíticos difieren de los procesos químicos convencionales dadas las características del catalizador como parámetros cinéticos, estabilidad de la proteína bajo las condiciones del proceso, si la enzima está aislada o forma parte del metabolismo de una célula, crecimiento celular, inducción de la actividad enzimática y/o el uso de rutas metabólicas para reacciones múltiples (Schmid *et al.*, 2001). El que un proceso sea sustentable implica una reducción en los costos de energía y materia prima, disminución de desechos, estabilidad y seguridad del proceso y calidad del producto. Algunas compañías han optado por usar enzimas, obteniendo un mayor rendimiento, reducción de materia prima, disminución de desechos y aumento en la calidad del producto (Schmid *et al.*, 2002). La primera aplicación de enzimas en procesos industriales fue en la elaboración

de detergentes en 1930, basándose en una patente de Otto Röhm, la cual describía el uso de enzimas pancreáticas en detergentes (Damhus *et al.*, 2008). La mayoría de los bioprocesos utilizan enzimas hidrolíticas o se basan en fermentación. Las condiciones de reacción para los bioprocesos generalmente están basadas en parámetros interdependientes, por lo tanto una descripción matemática del proceso es esencial para su optimización. El desarrollo de un bioproceso requiere de diferentes pasos: a) Identificar una reacción específica para escalarla y que sea costeable, b) Encontrar un biocatalizador que pueda catalizar la reacción deseada, c) Caracterizar el biocatalizador bajo las condiciones de trabajo del bioproceso (medio acuoso o mezcla agua-solvente), d) Aplicación, ya sea por inmovilización o sistemas múltiples, e) Recuperación del producto, (Figura 1).

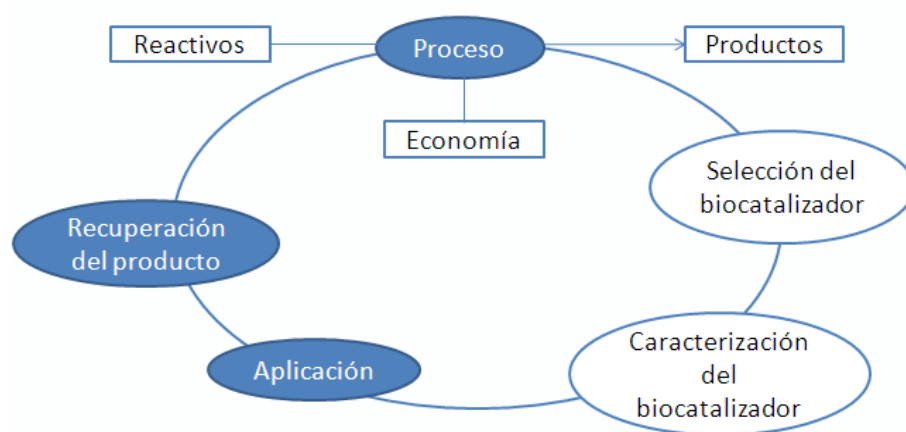


Fig. 1. Desarrollo de un proceso de biocatálisis (Modificado de Schmid *et al.*, 2000).

## BIOPROCESOS QUE UTILIZAN SOLVENTES ORGÁNICOS

Panke y colaboradores (2002) diseñaron un reactor en escala piloto para

epoxidación enantioselectiva de estireno en presencia de dioctil ftalato (50% v/v), obteniendo 307 gramos de óxido de (S)-estireno por destilación. A nivel industrial, la

compañía DSM utiliza medios no acuosos para producir (2R,3S)-3-(*p*-metoxyfenil) glicidil metil ester a partir de una mezcla racémica de *trans*-3-(*p*-metoxyfenil) glicidil metil ester utilizando lipasas, produciendo 100 toneladas al año (Kierkels & Peeters, 1994). A pesar de que algunos mecanismos no están claros sobre el efecto de solventes en catálisis, a continuación se presentan algunas bases para explicar estos fenómenos.

En general las enzimas funcionan en soluciones acuosas, por lo que los estudios sobre sistemas enzimáticos son en este tipo de soluciones, sin embargo, desde un punto de vista biotecnológico, el usar enzimas en solventes orgánicos en lugar de agua tiene ventajas, como la alta solubilidad de compuestos orgánicos en medios no acuosos, la habilidad de llevar a

cabo reacciones imposibles en agua por restricciones cinéticas o termodinámicas, estabilidad de la enzima, recuperación eficiente del producto y la insolubilidad de las enzimas en medios orgánicos, lo que permite su recuperación y reuso, con lo cual se excluye la inmovilización de enzimas (Zaks y Klibanov, 1985). Un modelo de estudio ideal para reacciones enzimáticas en solventes orgánicos debe satisfacer los siguientes criterios (Zaks y Klibanov, 1985): (a) La enzima debe estar disponible y debe ser costeable, (b) La enzima debe trabajar en ausencia de un cofactor, ya que la mayoría de los cofactores son insolubles en solventes orgánicos, (c) Los sustratos deben ser solubles en solventes orgánicos, (d) El agua no debe participar en la catálisis (Tabla 1).

**Tabla 1.** Ventajas y desventajas de usar solventes orgánicos en reacciones enzimáticas.

Ventajas	Desventajas
Se incrementa la solubilidad de sustratos hidrofóbicos	Algunas enzimas pueden perder actividad biológica
Pueden producirse reacciones químicas que no son posibles en soluciones acuosas	Se limita la transferencia de masas usando solventes viscosos
El equilibrio termodinámico se ve favorecido a reacciones de síntesis	En procesos en donde se requieren reacciones de condensación, se necesita un control de la actividad de agua
En medios no acuosos algunas enzimas pueden presentar especificidad solo por alguna región del sustrato o distinguir entre enantiómeros	
Las enzimas pueden recuperarse y reusarse sin tener que inmovilizarlas	
Se incrementan los rendimientos de separación de los productos	
Algunas enzimas son termoestables en sistemas anhidros.	
Se eliminan los riesgos de contaminación microbiana	

Las reacciones enzimáticas en solventes orgánicos proveen ventajas a la industria, ya que incrementan la solubilidad de sustratos no polares, se pueden revertir

las condiciones termodinámicas de equilibrio en reacciones de hidrólisis, se elimina la posibilidad de producir reacciones alternas al igual que reacciones

que dependen de la cantidad de agua disponible en el medio, se puede también alterar la especificidad por el sustrato y la enantioselectividad, y se elimina la contaminación microbiana. Sin embargo, la aplicación de enzimas en solventes orgánicos es restringida ya que muchas de las enzimas son menos activas y estables en presencia de solventes. Por lo tanto, se han desarrollado varios métodos para mantener o aumentar la actividad y estabilidad de las enzimas en presencia de solventes orgánicos para uso industrial. Estos métodos incluyen la inmovilización de enzimas en soportes, la modificación química de las enzimas, modificaciones físicas con lípidos o surfactantes, la inclusión de enzimas en micelas e ingeniería molecular. Algunas enzimas, de manera natural, son tolerantes a medios orgánicos, las cuales son las mejores candidatas para aplicaciones biotecnológicas ya que no se requiere modificar la enzima. La investigación dedicada a este tema durante los últimos 10 años ha sido a buscar enzimas de origen microbiano resistentes a solventes orgánicos.

## *Clasificación de los sistemas que usan solventes orgánicos*

Dependiendo de la miscibilidad del solvente en el agua y la relación de éstos en el medio, se pueden encontrar tres tipos de sistemas:

1) Co-solvente orgánico. En este tipo de mezclas, el solvente usado es miscible en agua. Estos sistemas tienen la función de incrementar la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos y reduciendo las

limitaciones de transferencia de masa, teniendo como consecuencia mayor eficiencia catalítica. Este sistema tiene la ventaja de que modifica el equilibrio termodinámico a favor de reacciones de síntesis.

2) Bifásico o sistema de dos fases. El sistema está compuesto por dos fases, una fase acuosa que contiene a la enzima disuelta y otra fase compuesta por un solvente inmiscible en agua. Entre la fase acuosa y la fase orgánica se forma una interface. El sustrato (hidrofóbico) se encuentra en la parte orgánica. El producto presenta características hidrofóbicas por lo cual puede extraerse de la fase orgánica.

3) Mezclas anhídras. Las enzimas en forma nativa son insolubles en solventes orgánicos, por lo tanto, en este tipo de sistemas, la liofilización, la inmovilización y la modificación con compuestos anfipáticos son opciones para solubilizar enzimas. La liofilización puede causar daños en la estructura de las proteínas por lo que la coliofilización con aditivos como algunos carbohidratos, polímeros y algunas sales previenen estos daños. La enzima proveniente de una solución acuosa con condiciones óptimas, presentan las mismas características catalíticas al liofilizarlas o precipitarlas, este fenómeno es llamado "Memoria al pH". En estos sistemas, las enzimas liofilizadas exhiben alta termoestabilidad, pero menor actividad que en sistemas acuosos. La actividad de agua es importante para la actividad enzimática. Como regla general, se sabe que en solventes hidrofóbicos, las enzimas muestran mayor actividad, comparando con enzimas en solventes hidrofílicos. La

movilidad conformacional de las enzimas es restringida en sistemas con poco agua. Esto lleva a que las enzimas presenten especificidades por sustrato únicas. En este tipo de sistemas, las reacciones más comunes son transesterificación de ésteres y síntesis de péptidos (Doukyo & Ogino, 2010).

## *Inactivación de enzimas en solventes orgánicos*

En general, el plegamiento de la estructura terciaria de las proteínas en medios acuosos da como resultado que los grupos polares en el exterior de la molécula interactúen con el medio y los grupos no polares a formar una coraza hidrofóbica al interior de la proteína. La estructura de la proteína se mantiene gracias al balance de las interacciones hidrofóbicas, interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno. La desnaturalización de las proteínas se da cuando el equilibrio de las interacciones se rompe. En medios orgánicos, la pérdida de actividad enzimática se debe al rompimiento de la coraza hidrofóbica dentro de la proteína. Los solventes polares pueden penetrar dentro de la proteína e inducir algunos cambios estructurales a diferencia de los solventes no polares.

La flexibilidad conformacional de las proteínas es crucial para mantener la actividad biológica de las proteínas. Las enzimas requieren de ciertas moléculas de agua unidas a la superficie de la estructura para funcionar. Como ya se mencionó anteriormente, en medios anhidros, la actividad decrece considerablemente, sin embargo, se ha comprobado que

añadiendo una cantidad mínima de agua, puede conservarse la actividad (Klibanov 2001).

## *Estabilización termodinámica de los sistemas de transición en solventes orgánicos*

Muchas enzimas tienen sitios activos hidrofóbicos, teniendo un incentivo energético para que los sustratos hidrofóbicos desplacen el agua cercana al sitio activo. Cuando el agua es reemplazada con solventes orgánicos, se estabilizan los estados de transición de los sustratos. El alterar el equilibrio termodinámico puede resultar en un decremento de la actividad enzimática. En 1998, Torres y colaboradores propusieron un modelo para evaluar el efecto de los solventes en la actividad, ya que el coeficiente de partición no se puede aplicar a solventes miscibles en agua. La hidrofobicidad (H) se considera como el coeficiente de partición del sustrato en el sitio activo de la enzima y en el medio no acuoso. Al incrementar la hidrofobicidad del solvente, el sustrato se desplaza del sitio activo al medio no acuoso, observando un decremento en la actividad catalítica. Este parámetro de hidrofobicidad correlaciona la actividad termodinámica del solvente orgánico en la mezcla de reacción y es inversamente proporcional a la polaridad del solvente. Ng y Tsai (2005) estudiaron las propiedades de una lipasa de papaya para sintetizar fármacos, especialmente el naproxeno y al hacer un análisis termodinámico encontraron diferencias en las energías de activación para la discriminación de enantiómeros, también

encontraron una compensación entre entalpía-entropía y lo atribuyen a la similitud de cadena de acilo de los sustratos.

## *Correlación entre la actividad enzimática y la naturaleza de los solventes orgánicos*

Muchos investigadores han intentado correlacionar la actividad enzimática y el efecto de los solventes en ésta. Laane y colaboradores (1987) han relacionado diferentes parámetros, como constante dieléctrica, momento dipolar y coeficiente de partición. El coeficiente de partición es el parámetro más usado para tratar de relacionar los efectos de los solventes en la actividad enzimática, sin embargo, los solventes sólo se pueden relacionar si pertenecen al mismo grupo funcional, por ejemplo alcoholes y polioles.

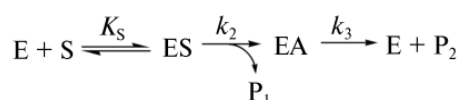
## *Biocatálisis en solventes orgánicos*

Existen pruebas de que las enzimas en medios orgánicos pueden tener actividad catalítica. En algunos casos se ha reportado que la actividad catalítica disminuye en diversos órdenes de magnitud cuando se exponen a medios orgánicos por lo cual hay que tener cuidado al momento de seleccionar los componentes de la mezcla de reacción (solventes, pH, concentración de iones y agua) para buscar una mayor actividad enzimática. Se sabe que el mecanismo de catálisis en medios orgánicos para las quimotripsinas se ve afectado con solventes miscibles en agua, Belyaeva y colaboradores en el 2002 encontraron que el dimetil sulfóxido y el etanol interactúan

con el sitio activo y propusieron cambios conformacionales en la proteína, formando "isómeros conformacionales" encontrando dos procesos paralelos: aceleración en las tasas de formación del compuesto enzima-sustrato y disminución de la tasa de deacilación (Figura 2). Para explicar este tipo de fenómeno se ha recurrido al concepto de barrido de puentes de hidrógeno, en donde la formación de un puente de hidrógeno entre Asp102 y His57 del sitio activo, tiene como consecuencia la alcalinidad del residuo His57 y su habilidad para atraer más protones del residuo Ser195, facilitando el ataque nucleofílico al grupo carbonilo del sustrato y la formación del intermediario tetraédrico. La formación del puente de hidrógeno entre Asp102 y His57 decrece la energía de activación para el sustrato se convierta en el intermediario tetraédrico. También se propuso en este trabajo que los solventes orgánicos tienen un efecto de compresión estérica entre el sitio activo y el sustrato para formar este puente de hidrógeno y así aumentar la afinidad por el sustrato, y que el etanol actúa como agente nucleofílico en la hidrólisis de la enzima acilada.

## *Efecto del agua en las reacciones de biocatálisis*

Cuando se habla de reacciones en medios no acuosos, se debe entender que la mayor parte del medio que rodea a la enzima es no acuoso, ya que una enzima dentro de su estructura contiene moléculas de agua que permanecen unidas a esta a pesar de tratamientos térmicos extremos. Una manera de cuantificar el agua en una



**Fig. 2.** Representación de la reacción de catálisis de  $\alpha$ -quimotripsina en presencia de solventes orgánicos. E (Enzima), S (Sustrato: N-acetil-L- tirosina *p*-nitroanilina), ES (Complejo enzima-sustrato), EA (Enzima acilada), P1 (Producto de la incubación de la enzima con etanol: *p*-nitroanilina), P2 (Producto de la enzima en medio acuoso: N-acetil-L-tirosina).

reacción es usar concentración de ésta en molaridad o por porcentaje en peso o en volumen, sin embargo las propiedades catalíticas de una enzima son las más influenciadas por la cantidad de agua unida a la enzima que por la cantidad de agua en el medio; desafortunadamente la medición de la cantidad de agua enlazada a una enzima puede ser un reto. Se acepta el concepto de actividad de agua para poder cuantificar el agua presente en el sistema (Drauz & Waldmann, 2002).

### *Control de la actividad de agua usando soluciones salinas saturadas*

Una manera de controlar la actividad de agua a nivel laboratorio es la de equilibrar el medio con soluciones salinas saturadas. Esto se basa en que la solubilidad de una sal en agua tiene un valor determinado a una temperatura determinada, podrá equilibrar el contenido de agua en una solución de menor saturación. La tabla 2 presenta el efecto de algunas sales en la actividad de agua (Carrera & Riva, 2008).

**Tabla 2.** Soluciones saturadas para controlar la actividad de agua. Los valores presentados se dan para trabajar a una temperatura de 25 °C.

Sal	Actividad de agua
LiCl	0.113
MgCl <sub>2</sub>	0.225
Acetato de potasio	0.328
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.432
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.529
SrCl <sub>2</sub>	0.708
KCl	0.843
KNO <sub>3</sub>	0.936
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.973

### *Lipasas como biocatalizadores*

Las lipasas (EC 3.1.1.3; triacilglicerol acilhidrolasas) son un grupo versátil de

biocatalizadores. Constituyen un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis y síntesis de acilglicéridos de cadena larga

cuando se da una interface entre los lípidos y el agua, fenómeno llamado activación interfacial (Kourist *et al.* 2010). La aplicación de lipasas en la industria ha sido destinada a la producción de detergentes, alimentos y saborizantes, fármacos, ésteres, agroquímicos, cosméticos y perfumería (Hasan *et al.* 2006). Sin embargo, la creciente necesidad de enzimas resistentes a las condiciones de trabajo de algunos procesos industriales hace indispensable la búsqueda de enzimas termoresistentes. Se ha visto que el proceso de desnaturalización de algunas enzimas en presencia de solventes disminuye dependiendo del solvente usado y de la actividad de agua (Ahmed *et al.* 2009, Mansfeld & Ulbrich-Hofmann 2007, Royter *et al.* 2009, Sekhon *et al.* 2005).

Al contrario de las carboxil-esterasas (EC 3.1.1.1), la catálisis ocurre cuando se da una interface entre los lípidos y el agua, y se ha demostrado que la mayoría de las lipasas presentan un fenómeno llamado activación interfacial, lo que significa que una actividad catalítica alta solo se observará en presencia de una fase hidrofóbica (triacilglicéridos dispersos en agua o en solventes orgánicos). Este fenómeno está relacionado con la presencia de un oligopéptido hidrofóbico llamado "lid" o "flat" cubriendo la entrada al sitio activo. En presencia de un ambiente hidrofóbico, este oligopéptido o "lid" se desplaza y el sustrato puede entrar al sitio de enlace. Existen lipasas que no necesitan de activación interfacial como las de *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida antarctica* B, pero

todas estas tienen una pequeña "lid" (Kourist *et al.* 2010).

Un ejemplo sobre el efecto de los solventes en la actividad de lipasas es que pueden distinguir entre enantiómeros, en el 2000, Overbeeke y Heijen estudiaron el efecto de la acetona y una mezcla de octano-ciclohexano para reacciones de hidrólisis y esterificación añadiendo un exceso de enantiómeros sustrato y de productos la ecuación de la figura 3 en donde determinaron los excesos de enantiómeros representando como  $ee_s$  y  $ee_p$ . Encontraron que la composición de los solventes afecta a la enantioselectividad, aumentando este valor hasta en 50%. En el 2003, Ghanem estudio el efecto ciclodextrinas y solventes orgánicos en la capacidad de transesterificación de lipasas y encontró que la tasa de enantioselectividad también aumentaba. La estrategia que siguió fue liofilizar una lipasa con ciclodextrinas y encontró que la lipasa podía catalizar la transesterificación de 1-(2-furil)-etanol en tolueno. A nivel industrial, las lipasas se utilizan para la producción de alcoholes enantiopuros a partir de mezclas racémicas, por la compañía BASF (Schöfer *et al.* 2001).

### *Efecto de solventes orgánicos en enzimas*

La aplicación de enzimas en solventes orgánicos es restringida ya que muchas de las enzimas son menos estables en presencia de solventes por lo que se han desarrollado métodos para mantener o aumentar la actividad y estabilidad de las enzimas para uso industrial. Estos métodos



$$E = \frac{\ln\left(\frac{1 - ee_s}{1 + ee_s/ee_p}\right)}{\ln\left(\frac{1 + ee_s}{1 + ee_s/ee_p}\right)}$$

**Fig. 3.** Ecuación para estudiar la capacidad de enantioselectividad en enzimas en donde se relacionan constantes de especificidad para dos enantiomeros, ya sea del sustrato o del producto y la velocidad de reacción para cada enantiomero.

incluyen la inmovilización de enzimas en soportes, modificación química de las enzimas, modificaciones físicas con lípidos o surfactantes, encapsulamiento de enzimas en micelas e ingeniería molecular. Algunas enzimas, de manera natural, son tolerantes a medios orgánicos, las cuales son las mejores candidatas para aplicaciones biotecnológicas ya que no se requiere modificar la enzima (Okamoto & Ueji 2000).

En general, lipasas microbianas aumentan su actividad catalítica en solventes con Log P igual o mayor a 2, y a valores menores a 2, la actividad enzimática disminuye considerablemente (Laane et al. 1987). El amplio uso de enzimas en procesos industriales ha creado la necesidad de identificar nuevas fuentes de enzimas de bajo costo. El potencial uso de enzimas de peces y otros organismos marinos como fuentes de lipasas sigue en investigación. Se tienen reportes de lipasas que mantienen su actividad catalítica en concentraciones mayores a 40% de solventes polares (Kurtovic et al. 2010, Maytorena 2011).

Una enzima en su forma nativa presenta una estructura tridimensional con geometrías precisas para poder

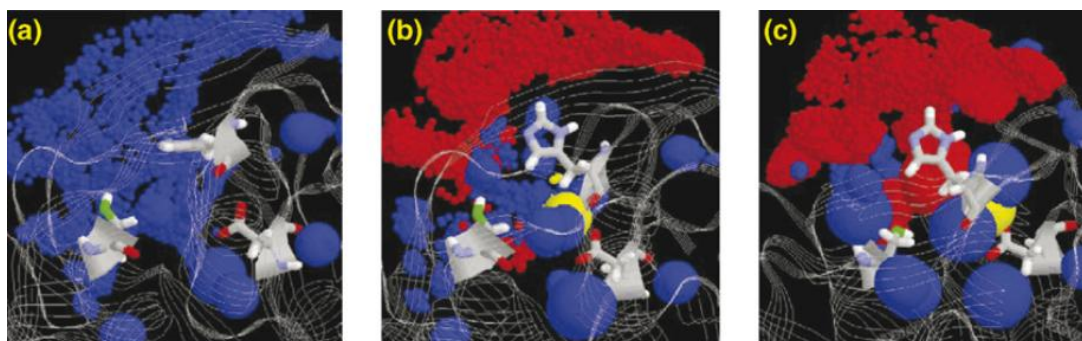
transformar moléculas con exquisita fidelidad y selectividad en soluciones acuosas (Serdakowski & Dordick, 2007). En medios no acuosos, las enzimas pueden presentar diferentes efectos como la separación de las diferentes moléculas de enzimas, esto se refiere a que en conformación nativa el balance de la estructura proteica esta dado por interacciones no covalentes, como puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas. El agua es un requisito para que se den estas interacciones. En presencia de solventes orgánicos, estas interacciones se rompen, teniendo como consecuencia el desplegamiento de la estructura de la proteína. Como característica de los solventes orgánicos polares, éstos pueden penetrar dentro de la estructura proteica, siendo capaces de inducir cambios en las estructuras secundaria y terciaria. En enzimas con estados de transición altamente polares, la interacción con solventes orgánicos reduce la polaridad del sitio activo desestabilizando los estados de transición polares en la catálisis (Serdakowski & Dordick, 2007). En la figura 4 se presenta un modelo de interacción del agua (esferas azules) y del

octano (esferas rojas) en el sitio activo de subtilisina haciendo una modelación de desplazamiento de moléculas de agua por parte de las moléculas de octano. En la tabla 3 se presentan algunos solventes usados en la industria y algunas características. El término coeficiente de partición es la razón entre las concentraciones de esa sustancia en las dos fases de la mezcla formada por dos disolventes inmiscibles en equilibrio. Constante dieléctrica se refiere a la medida de las propiedades de un solvente para mantener cargas opuestas separadas. El parámetro de Reichardt-Dimroth es una medida de la polaridad ionizante (pérdida de la polaridad) de un disolvente basado en la longitud de onda máxima de la banda de absorción de mayor longitud de onda

máxima de la banda de absorción de mayor longitud de onda de un disolvente determinado. El parámetro de solubilidad de Hildebrand se define como la suma de todas las fuerzas de atracción intermoleculares de una sustancia (Costa 2005).

#### *Uso de solventes en síntesis*

Las proteasas de origen microbiano pueden funcionar como catalizadores en medios con solventes orgánicos con lo cual se pueden ofrecer nuevas posibilidades a la industria, ya que puede darse un cambio en el equilibrio termodinámico a favor de la síntesis, incrementando la solubilidad de los sustratos hidrofóbicos, puede controlarse la especificidad con el uso de solventes y también puede aumentar la



**Fig. 4.** Representación de la interacción de un solvente orgánico en el sitio activo de una enzima dependiendo de la polaridad del solvente (Serdakowski & Dordick, 2007). Las esferas azules representan a moléculas de agua y las esferas rojas representan a moléculas de solvente orgánico. Las esferas de mayor volumen simulan una mayor densidad de agua o solvente según sea el caso. Los aminoácidos del sitio activo están representados en barras (Asp32, His64 y Ser 121). La figura 4a muestra la interacción de subtilisina en agua. Cuando la enzima esta en contacto con octano, el agua difícilmente puede interactuar con el sitio activo (Fig. 4b). Sin embargo, cuando la enzima esta en contacto con un solvente relativamente polar (tetrahidrofurano), el solvente si puede interactuar con esa área de la proteína (Fig. 4c).

# Artículos

**Tabla 3.** Solventes usados en la industria y parámetros de solubilidad. Log P: Coeficiente de partición entre octanol y agua.  $\epsilon$ : Constante dieléctrica. ET: Parámetro de polaridad empírica de Reichardt- Dimroth. HS: Parámetro de solubilidad de Hildebrand. Sw/o: Solubilidad del agua en el solvente. So/w: Solubilidad del solvente en agua (Carrea & Riva, 2008).

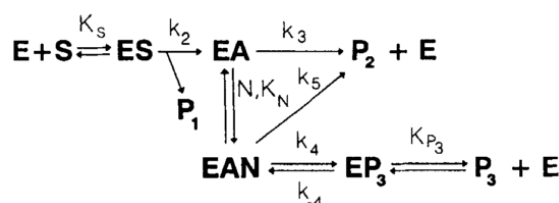
Solvente	Log P	$\epsilon$	ET	HS	Sw/o	So/w
DMF	-1.01	36.71	0.404	20.3	100	
Metanol	-0.77	32.66	0.762	29.7	100	100
Etanol	-0.31	24.55	0.654	26.1	100	100
1,4-Dioxano	-0.27	2.21	0.164	20.7	100	100
Acetona	-0.24	20.56	0.355	20.5	100	100
2-Butanona	0.29	18.51	0.327	19	10	24
Piridina	0.65	12.91	0.302	21.7	100	100
Acetato de etilo	0.73	6.02	0.228	18.6	2.94	8.08
1-Butanol	0.88	17.51	0.506	23.7	20.5	7.45
Éter dietílico	0.89	4.2	0.117	15.1	1.47	6.04
Diisopropil éter	1.52	3.88	0.102	14.4	0.57	1.2
Acetato de butilo	1.7	5.01		17.4	1.2	0.68
Benceno	2.13	2.27	0.111	18.7	0.0635	0.179
1,1,1-Tricloroetano	2.49	7.25	0.17	17.4	0.034	0.132
Tolueno	2.73	2.38	0.099	18.2	0.0334	0.0515
Hexano	3.98	1.88	0.009	14.9	0.0111	0.00123
Heptano	4.57	1.92	0.012	15.2	0.0091	0.000357

termoestabilidad de las enzimas (Rahman, 2007). En 1996, Cerovsky y Jakubke estudiaron la especificidad nucleofílica de la subtilopeptidasa A, y encontraron que no es una opción viable para síntesis de péptidos en medios acuosos, pero explicaron las bases moleculares porque si es una buena opción en medios orgánicos. Investigaron las constantes de partición de la subtilisina acilada en agua y en 10% de acetonitrilo, y una serie de derivados de aminoácidos teniendo glicina como nucleófilos. Los autores calcularon las constantes de partición siguiendo el siguiente esquema (Figura 5) y la ecuación  $(d[P2]/dt)/(d[P3]/dt) = p/[N]$ , en donde [N] equivale a la concentración del nucleófilo y

p la constante de partición. Los autores concluyeron que los solventes orgánicos bajo condiciones alcalinas, los amino de los nucleófilos se encuentran desprotonados, siendo esto un requisito para que los nucleófilos participen en la transferencia de acilos. También se encontró que se necesitan residuos de glicina continuos u otros residuos hidrofílicos pequeños para que puedan participar en la reacción y se dedujo que existen interacciones electroestáticas entre los residuos cargados negativamente de la enzima y los residuos cargados positivamente del sustrato, concluyendo que los péptidos (sustratos) con residuos hidrofílicos alrededor de glicina en suspensiones

orgánicas presentan características nucleofílicas al contrario de aminoácidos alifáticos y aromáticos alrededor de glicina. En la tabla 4 se presenta un listado de las enzimas más usadas en reacciones de

síntesis en medios orgánicos, en la columna 1 se enlistan las enzimas que no necesitan cofactores y en la columna 2 las enzimas que requieren cofactor y qué tipo de cofactor (Carrea & Riva 2008).



**Fig. 5.** Reacción de catálisis en la transferencia de acilo. E (Enzima), S (Ester donador de acilo; componente carboxilo), N (nucleófilo; componente amino), P1 (Grupo saliente del compuesto éster), P2 (Producto de hidrólisis), P3 (Péptido producto), EA (Enzima acilada), EAN (Complejo nucleófilo-enzima, acilo). (Cerovsky y Jakubke 1996).

**Tabla 4.** Enzimas comúnmente usadas en síntesis en medios orgánicos (Carrea & Riva, 2008).

No requieren cofactores	Requieren de cofactores
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esterasas</li> <li>• Lipasas</li> <li>• Amilasas</li> <li>• Fosfolipasas</li> <li>• Epoxido hidrasas</li> <li>• Nucleótido fosfoliasa</li> <li>• SAM sintetasa</li> <li>• Glucosa isomerasa</li> <li>• Aspartasa</li> <li>• Fenilalanina amonia liasa</li> <li>• Fumarasa</li> <li>• Cianohidrina sintetasa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quinasas –ATP</li> <li>• Oxidoreductasas –NAD(P)(H)</li> <li>• Metiltransferasas – SAM</li> <li>• Enzimas que dependen de CoA</li> <li>• Sufuriliasas - PAPS</li> </ul>

### Enzimas inmovilizadas

La inmovilización de biocatalizadores para sistemas continuos de producción se da cuando las enzimas, como las células se inmovilizan en un soporte de manera que el sustrato se vaya transformando continuamente sin que se pierda la enzima, como ocurre con los métodos de lote. Sin embargo, a pesar de todos los esfuerzos y desarrollos tecnológicos en este campo, estos métodos presentan todavía muchos problemas, por lo que no se han podido utilizar en forma generalizada. Entre los métodos más comunes de inmovilización

podemos mencionar la adsorción en soportes poliméricos, como los de polivinilo y de poliacrilamida; la microencapsulación en membranas semipermeables de celulosa o nylon; el entrecruzamiento para formar un producto insoluble, y la unión covalente a soportes insolubles. Esta metodología ha permitido que se diseñen electrodos que, a semejanza de los de un potenciómetro para medir pH, se utilizan en la determinación de diversos compuestos, como son los azúcares. En un nivel comercial pocas son las enzimas que se emplean de esta manera; entre ellas

destacan la glucosa isomerasa y la aminoacilasa (Badui, 1993). Tang y colaboradores en el 2007, inmovilizaron lipasas alcalinas en nanopartículas de quitosano para que trabajaran en medios ácidos y encontraron que estas enzimas al inmovilizarlas en la superficie de las esferas, presentaban actividad catalítica lo cual podría ser una opción para estudiar enzimas lábiles en otro tipo de medios.

## CONCLUSIÓN

Se han encontrado enzimas resistentes a solventes orgánicos en la mayoría de los microorganismos y en los últimos 10 años se han encontrado enzimas resistentes a solventes en otros organismos como peces, crustáceos, mamíferos y plantas, y la estabilidad en medios no acuosos varía dependiendo de las características del solvente y la concentración en el medio, se ha puesto especial atención a hidrolasas, pero también se ha encontrado resistencia a solventes en otro tipo de enzimas, como las oxidoreductasas.

## REFERENCIAS

- Ahmed EH, Raghavendra T & Madamwar D (2009) A thermostable alkaline lipase from a local isolate *Bacillus subtilis* EH 37: Characterization, partial purification, and application in organic synthesis. *Appl. Biochem. Biotech.* 160: 2102-2113.
- Badui D (1993) Química de los alimentos. Pearson Educación.
- Belyaeva EA, Gra DV & Eremeev NL (2002) On the mechanism of interaction of organic solvents with the active site of  $\alpha$ -chymotrypsin. *Biochem. (Moscow)* 67(9): 1032-1036.
- Carrea G, Riva S (2008) Organic synthesis with enzymes in non-aqueous media. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Cerovsky V & Jakubke HD (1996) Nucleophile specificity of subtilisin in an organic solvent with low water content: Investigation of via acyl transfer reactions. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 553-558.
- Costa JM (2005) Diccionario de química física. Ediciones Díaz de Santos.
- Damhus T, Kaasgaard S, Lunquist H, Olsen HS (2008) Enzymes at work. Tercera edición. Novozymes Research & Development. Reporte técnico No. 2008-08235-01.
- Doukyu N & Ogino H (2010) Organic-solvent tolerant enzymes. *Biochem. Eng. J.* 48: 270-282.
- Drauz K & Waldmann H (2002) Enzyme catalysis in organic synthesis, A comprehensive handbook. Segunda edición. WILEY-VCH.
- Kierkels JGT & Peeters WHP (1994) Process for the enzymatic preparation of optically active transglycidic acid esters. Patente EP0602740.
- Klibanov A (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 409: 241-246.
- Kourist R, Brundiek H & Bornscheuer UT (2010) Protein engineering and discovery of lipases. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 112: 64-74.

- Kurtovic I, Marshall S, Zhao X & Simpson B (2009) Lipases from mammals and fishes. *Rev. Fish. Sci.* 17(1): 18-40.
- Ghanem A (2003) The utility of cyclodextrins in lipase-catalyzed transesterification in organic solvents: enhanced reaction rate and enantioselectivity. *Org. Biomol. Chem.* 1: 1282-1291.
- Hasan F, Shah AA & Hameed A (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Tech.* 39: 235-251.
- Laane C, Boeren S, Vos K & Veeger C (1987) Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 36: 81-87.
- Mansfeld J & Ulbrich-Hofmann R (2007) The stability of engineered thermostable neutral proteases from *Bacillus stearothermophilus* in organic solvents and detergents. *Biotechnol. Bioeng.* 97: 672-679.
- Maytorena C (2011) Efecto de solventes orgánicos y temperatura en la actividad enzimática de las lipasas digestiva e intracelular de *Penaeus vannamei*. Tesis de Maestra en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, Baja California Sur. Pp.1-56.
- Ng IS & Tsai SW (2005) Partially purified *Carica papaya* lipase: A versatile biocatalyst for the hydrolytic resolution of (R,S)-2-Arylpropionic thioesters in water-saturated organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 91(1): 106-113.
- Okamoto T & Ueji S (2000) A new method for improving the enantioselectivity of lipase-catalyzed hydrolysis in organic solvent containing a small amount of water in the presence of metal ions. *Biotechnol. Lett.* 22: 1169-1171.
- Overbeeke PL, Jongejan JA & Heijnen JJ (2000) Solvent effect on lipase enantioselectivity, evidence for the presence of two thermodynamic states. *Biotechnol. Bioeng.* 70(3): 278-290.
- Panke S, Held M, Wubbolts MG, Witholt B & Schmid A (2002) A pilot-scale production of (S)-styrene oxide from styrene by recombinant *Escherichia coli* synthesizing styrene monooxygenase. *Biotechnol. Bioeng.* 80: 33-41.
- Royter M, Schmidt M, Elend C, Höbenreich H, Schäfer T, Bornscheuer UT & Antranikian G (2009) Thermostable lipases from the extreme thermophilic anaerobic bacteria *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* SOL1 and *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *tengcongensis*. *Extremophiles.* 13(5): 769-783.
- Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, & Witholt B (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409: 258-268.
- Schmid A, Hollmann F, Byung Park J & Bühler B (2002) The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Curr. Opin. Biotech.* 13: 359-366.
- Schöfer SH, Kaftzik N, Wasserscheid P & Kragl U (2001) Enzyme catalysis in ionic liquids: lipase catalysed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity. *Chem. Commun.* DOI: 10.1039/b009389k.
- Sekhon A, Dahiya N, Tiwari RP & Hoondal GS (2005) Properties of a thermostable

- extracellular lipase from *Bacillus megaterium* AKG-1. *J. Basic Microb.* 45(2): 147-154.
- Serdakowski AL, Dordick JS (2007)  
Enzyme activation for organic solvents made easy. *Trends Biotechnol.* 26(1): 48-54.
- Tang ZX, Qian JQ & Shi LE (2007)  
Characterizations of immobilized neutral lipase on chitosan nano-particles. *Mater. Lett.* 61: 37-40.
- Torres E, Siminovich B, Barzana E & Vazquez-Duhalt R (1998)  
Thermodynamic hydrophobicity of aqueous mixtures of water-miscible organic solvents predicts peroxidase activity. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 4:155-159.
- Yeom SH & Daugulis AJ (1999) A new method for the determination of microbial activity and critical logP in the presence of organic solvents. *Biotechnol. Technol.* 13: 549-553.
- Zaks A & Klibanov A (1985) Enzyme-catalyzed process in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 3192-3196.