

Medidas de actividad y estabilidad de biocatalizadores basados en CALB inmovilizada sobre SiO₂



LLERENA SUSTER, Carlos¹; GIACCIO, Pablo¹; MORCELLE del VALLE, Susana²; BRIAND, Laura¹

¹ Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CIPROVE), Depto. de Cs. Biológicas, Fac. Cs. Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, B1900AJK, La Plata, Buenos Aires, Argentina.
² Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas -Dr Jorge J. Ronco CINDECA-CCT La Plata CONICET, Calle 47 N° 257, B1900AJK, La Plata, Buenos Aires, Argentina
 e-mail: carlos.llerenasuster@gmail.com



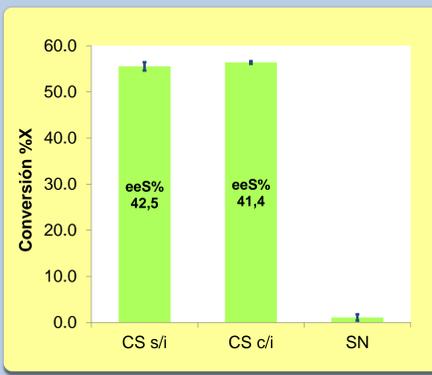
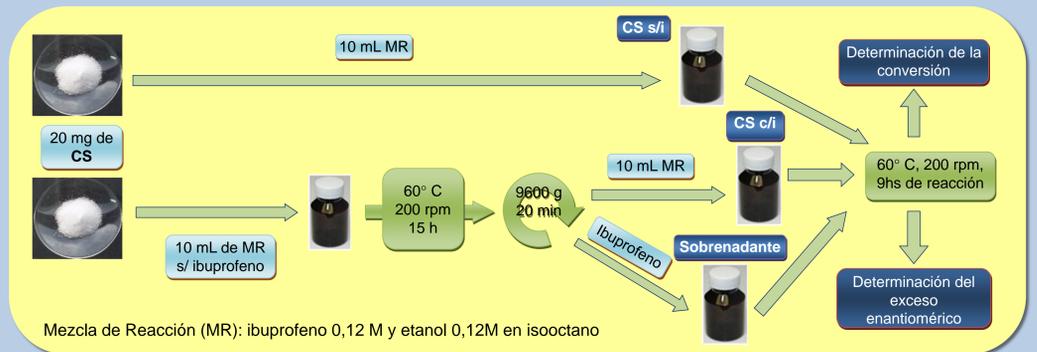
Los biocatalizadores preparados por adsorción simple de la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) sobre dióxido de silicio nanoestructurado junto a las enzimas libres provenientes de un extracto crudo comercial y al biocatalizador comercial Novozym®435 se utilizaron para esterificar ibuprofeno con etanol en isoocetano como co-solvente. En este sentido se evaluó la actividad y la estabilidad térmica a 45°C, 60°C y 70°C.



Análisis de las muestras de actividad

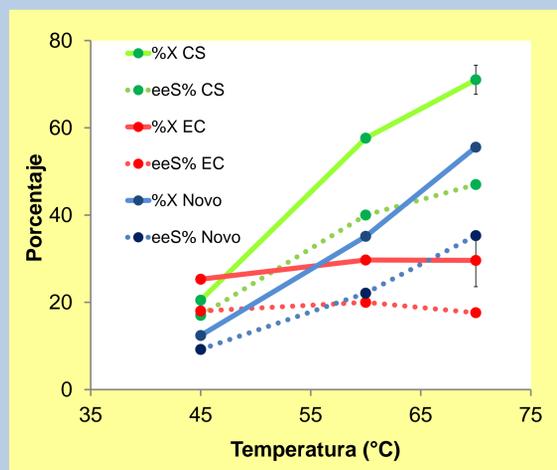
De cada ensayo de actividad se tomaron 50 µL para determinar el exceso enantiomérico de sustrato (eeS%), mediante HPLC utilizando una columna quiral (Núcleo Dex β PM), mientras que sobre el volumen restante se determinó el porcentaje de conversión (%X) mediante titulación contra una solución estandarizada de KOH 0,1 M en etanol.

Determinación de la desorción de proteínas



No se observa actividad en el sobrenadante luego de la incubación, mientras que tanto %X como eeS% obtenidos con ambos biocatalizadores fueron similares por lo que se descarta la desorción de enzima activa al medio de reacción.

Actividad a distintas temperaturas



Se pudo observar que...

A 45°C las enzimas libres presentan mayor actividad que las inmovilizadas.

Las enzimas libres no varían su actividad a pesar del aumento de la temperatura mientras que las inmovilizadas presentan un gran incremento de su actividad.

Los valores eeS% son proporcionales a los %X a excepción de lo observado en los ensayos a 70°C donde resultan menores a lo esperado.

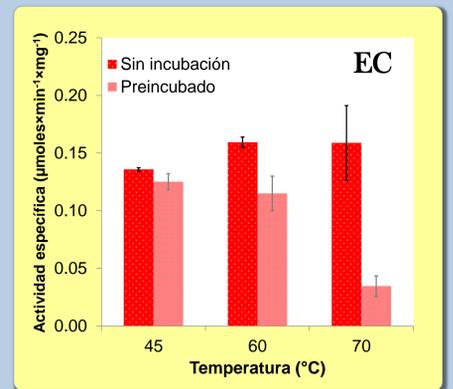
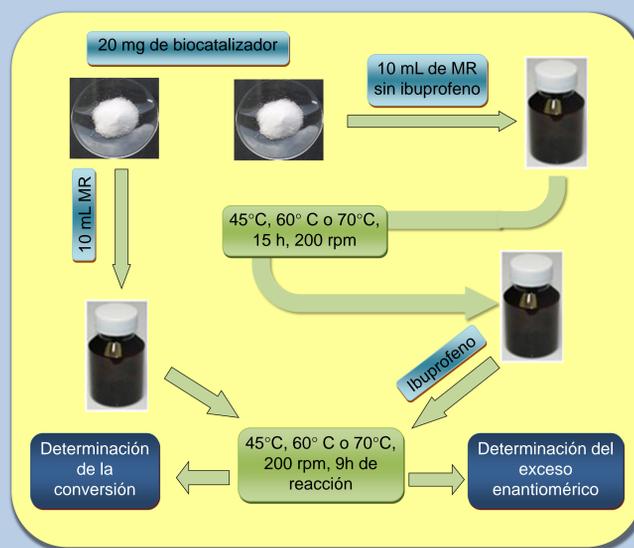
Esto puede deberse a restricciones difusionales y/o debido a una desnaturalización parcial de las enzimas durante el proceso de inmovilización.

Dicha observación estaría mostrando que a temperaturas elevadas, los biocatalizadores pierden selectividad.

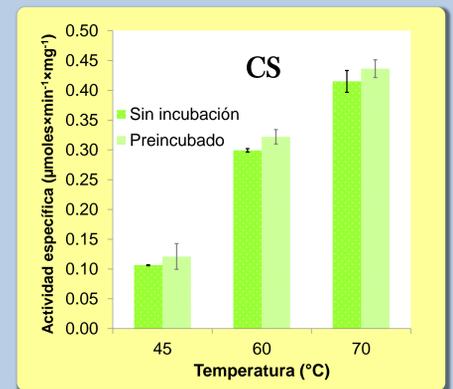
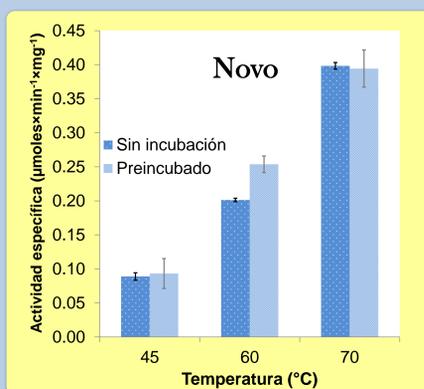
Para las enzimas libres, el efecto de aumento de actividad por la temperatura se estaría compensando por una desnaturalización parcial de las enzimas, desnaturalización minimizada para la CALB inmovilizada.

En todas las condiciones ensayadas el biocatalizador preparado resultó mejor que el comercial tanto en actividad como en enantioselectividad

Estabilidad térmica de CS, Novo y CALB libre



Se puede observar que la preincubación a 45°C no produce ningún efecto en la actividad de la CALB libre, sin embargo cuando se eleva la temperatura esta se ve afectada, especialmente a 70°C.



Los valores de eeS% en los ensayos con preincubación mostraron que se mantiene la proporcionalidad observada en los ensayos sin incubación, por lo que se concluye que la incubación no produce alteraciones en este aspecto.

En los ensayos realizados se corroboró no sólo la estabilidad de la CALB inmovilizada en medios orgánicos en altas temperaturas sino también sus efectos positivos en la actividad.

