

DISEÑO DE BIOCATALIZADORES ENZIMÁTICOS PARA QUÍMICA FINA: ESTABILIZACIÓN, REACTIVACIÓN Y MODULACIÓN DE PROPIEDADES CATALÍTICAS

José Manuel Guisán

Laboratorio de Tecnología Enzimática. Instituto de Catálisis. CSIC. Madrid, España.

Las enzimas son capaces de catalizar procesos extraordinariamente selectivos en condiciones experimentales muy suaves. De hecho en los últimos años se han publicado miles de trabajos sobre procesos de química fina y química farmacéutica catalizados por enzimas: oxidaciones e hidroxilaciones selectivas, protecciones y desprotecciones regioselectivas, síntesis asimétricas, resolución de mezclas racémicas, etc. Sin embargo, tanto la mejora de estos procesos a escala de laboratorio como su posible escalado a nivel industrial requieren una buena integración de técnicas de química orgánica (para diseñar los bioprocesos) y técnicas de bioquímica y biofísica (para diseñar los biocatalizadores adecuados).

En esta comunicación se discute la aplicabilidad de diferentes técnicas bioquímico-físicas para el diseño de nuevos y mejores biocatalizadores de lipasas y penicilina acilasas, dos familias de enzimas de máximo interés en química fina.

Inmovilización orientada sobre la superficie del soporte

La elección de diferentes áreas de la superficie de la enzima para su inmovilización provoca diferentes alteraciones en los cambios conformacionales que sufre la enzima durante los procesos catalíticos y consecuentemente los derivados inmovilizados con distintas orientación presentan diferentes propiedades catalíticas.

Inmovilización por unión covalente multipuntual

El hecho de que varios residuos enzimáticos se involucren en el proceso de inmovilización provoca un aumento de rigidez de la enzima inmovilizada y con ello un extraordinario aumento de su estabilidad asociada, sobre todo en el caso de las lipasas, a interesantes alteraciones de las propiedades catalíticas.

Modificación química adicional

La modificación química de moléculas de enzimas inmovilizadas (utilizando fundamentalmente sus grupos amino y carboxilo) nos permite alterar la hidrofobicidad de su superficie así como realizar

modificaciones con macromoléculas polifuncionales (p.e. glicosilaciones artificiales). De este modo podemos lograr modificaciones muy difíciles o imposibles de obtener por rutas genéticas (ya que promoverían plegamientos incorrectos) o por modificación química de las enzimas solubles (ya que podrían promover agregaciones).

Estrategias de reactivación mediante técnicas de desplegamiento y replegamiento.

La inactivación de derivados de enzimas inmovilizadas covalentemente cuando se utilizan a pH y temperatura moderadas y en presencia de disolventes orgánicos inertes no debe provocar ningún proceso de inactivación irreversible (modificación química, agregación, etc.). Sin embargo a pesar del carácter reversible de estas inactivaciones, en muchos casos es necesario desplegar completamente las estructuras enzimáticas incorrectas provocadas por la inactivación (p.e. por incubación en urea o guanidina) para que posteriormente la enzima se repliegue muy rápida y completamente a su estructura inicial activa.

La combinación de las diferentes estrategias y herramientas comentadas anteriormente nos ha permitido diseñar:

a) Procesos de resolución de mezclas racémicas de α -hidroxi ácidos por hidrólisis enantioselectiva de sus ésteres utilizando derivados de lipasa de *Pseudomonas fluorescens* logrando excesos enantioméricos superiores al 99 % con catalizadores cientos de veces más estables que la enzima nativa y al mismo tiempo completamente reactivables después de inactivaciones parciales en disolventes a temperatura moderada y pH neutro.

b) Procesos de síntesis de antibióticos β -lactámicos (p.e. cefazolina y cefalexina) catalizados por derivados de penicilina G acilasa de *Escherichia coli* miles de veces más estables que la enzima nativa, completamente reactivables y con propiedades sintéticas mucho mejores que la enzima nativa. De este modo hemos logrado rendimientos de síntesis superiores al 95 % con mezclas de reacción muy sencillas.