

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/062943 A2

(43) Fecha de publicación internacional
18 de mayo de 2012 (18.05.2012)

PCT

- (51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar
- (21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES2011/000325
- (22) Fecha de presentación internacional: 8 de noviembre de 2011 (08.11.2011)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad: P201031636
8 de noviembre de 2010 (08.11.2010) ES
- (71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): UNIVERSIDAD DE SEVILLA [ES/ES]; OTRI - Universidad de Sevilla, Pabellón de Brasil, Paseo de las Delicias s/n, E-41013 Sevilla (ES). CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): PÉREZ GÓMEZ, Dolores [ES/ES]; Facultad de Farmacia, C/ Profesor García González 2, E-41012 Sevilla (ES). VENTOSA UCERO, Antonio [ES/ES]; Facultad de Farmacia, C/ Profesor García González 2, E-41012 Sevilla (ES). MELLADO DURÁN, Encarnación [ES/ES]; Facultad de Farmacia, C/ Profesor García González 2, E-41012 Sevilla (ES). GUI SAN SEIJAS, José Manuel [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). FERNÁNDEZ LORENTE, Gloria [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). FILICE, Marco [IT/IT]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:
- sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))
 - con información relativa a la incorporación por referencia de partes y/o elementos ausentes (Regla 20.6)

(54) Title: LIPASE LIPBL AND THE APPLICATIONS THEREOF

(54) Título : LIPASA LIPBL Y SUS APLICACIONES

(57) Abstract: The invention relates to the use of the lipase LipBL for the hydrolysis of different substrates selected from p-nitrophenols, tributyrin, Tween 80, oils, chiral and prochiral substrates, fish oil, peracetylated sugars or nitrocefin, and to an enzymatic method for the regioselective monodeprotection of peracetylated sugars for producing monoacetylated sugars.

(57) Resumen: La presente invención se refiere al uso de la lipasa LipBL para la hidrólisis de distintos sustratos seleccionados de entre p-nitrofenoles, tributirina, Tween 80, aceites, sustratos quirales y proquirales, aceite de pescado, azúcares paracetilados o nitrocefin y a un procedimiento enzimático de monodesprotección regioselectiva de azúcares paracetilados para la obtención de azúcares monodesacetilados.



WO 2012/062943 A2

LIPASA LIPBL Y SUS APLICACIONES

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuadra de forma general en el campo de la microbiología enzimática y más en particular se refiere a biocatalizadores químicos, farmacéuticos o alimentarios.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las lipasas constituyen el grupo de biocatalizadores más importante por sus aplicaciones biotecnológicas. Las razones de este enorme potencial biotecnológico de las lipasas microbianas se debe a que son estables en disolventes orgánicos, no requieren cofactores, poseen un amplio rango de especificidad de sustrato y presentan una alta enantioselectividad (Jaeger y Reetz, 1998, Trends Biotechnol, 16: 396-403). Además, pueden ser producidas en grandes cantidades, ya que la mayoría se obtienen con gran rendimiento de microorganismos tales como hongos o bacterias (Jaeger y Eggert, 2002, Curr Opin Biotechnol., 13: 390-397).

La utilización de lipasas como catalizadores en numerosos procesos industriales está cada día más extendida, ya que presenta una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos (Arroyo, 1998, Ars Pharm 39: 23-39): poseen una gran actividad catalítica, muestran una gran especificidad de sustrato, son muy activas a temperatura ambiente y presión atmosférica. Sin embargo, determinados factores como, el hecho de que la mayoría de las lipasas no son estables en las condiciones de trabajo y son difícilmente reutilizables, han contribuido a que su uso industrial no se haya generalizado.

La inmovilización de estas enzimas ha ayudado a superar estos inconvenientes, llevándose a cabo un proceso mediante el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte (Taylor, 1991, Marcel Dekker). La unión a soportes es el método de inmovilización más utilizado. La elección del soporte y del tipo de enlace es fundamental en el comportamiento posterior del biocatalizador. Los soportes de naturaleza hidrofóbica, se utilizan además de para inmovilizar lipasas, para la purificación de las mismas aprovechando el distinto comportamiento que muestran

éstas hacia los diferentes soportes de esta naturaleza. Hasta el momento, hay una gran cantidad de soportes de diferente naturaleza descritos para la inmovilización de estas enzimas: por ejemplo, para la mejora de sus propiedades, la lipasa de *Penicillium simplicissimum* fue inmovilizada en soportes hidrofóbicos (unión reversible) (Cunha y col., 2009, Appl Biochem Biotechnol., 156: 133-145), otra lipasa descrita como la de *Bacillus thermocatenuatus*, se inmovilizó en el soporte glioxyl agarosa para aumentar su estabilidad debido a que en este soporte la unión es covalente y la estructura de la enzima fijada a él es más rígida (Fernández-Lorente y col., 2008, *Biomacromolecules* 9: 2553-2561) y otras lipasas descritas como la de *Yarrowia lipolytica* se inmovilizó a soportes de diferentes características para estudiar su comportamiento en cada uno de ellos (Cunha y col., 2008, Appl Biochem Biotechnol., 146: 49-56).

En cuanto a los métodos de purificación de estas enzimas, existen múltiples procesos dependiendo si la purificación se realiza desde el microorganismo original que las produce como es el caso de las lipasas de *Staphylococcus warneri* (Volpato y col., 2010, J Chromatogr A. 1217: 473-478) y de *Penicillium simplicissimum* (Cunha, y col., 2009, Appl Biochem Biotechnol., 156: 133-145), si se realiza desde *Escherichia coli* por clonación del gen que codifica la proteína en vectores de expresión como pBC o pKS como es el caso de la penicilin G acilasa (Fuentes y col., 2007, *Biomacromolecules.*, 8: 703-707.), o si se realiza desde *E. coli* por clonación del gen en un vector inducible que le añade a la proteína colas de polihistidinas, en cuyo caso, la purificación es bastante más sencilla como es el caso de numerosas enzimas como la lipasa de *Clonorchis sinensis* (Hu y col., 2009, *Zhongguo.*, 27: 95-101).

Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (PUFAs) desempeñan funciones muy importantes en la gestación, lactancia e infancia ya que son constituyentes de los fosfolípidos de las membranas celulares y forman parte de las estructuras neuronales. Estos ácidos grasos esenciales tienen muchos efectos beneficiosos en el organismo: son importantes para mantener la estructura y la función de la membrana celular y las membranas subcelulares, para producir las prostaglandinas que regulan procesos como la inflamación y la coagulación, para un correcto desarrollo de vasos sanguíneos y nervios y además mantienen la piel y otros tejidos jóvenes y flexibles debido a su capacidad lubricante (O'Keefe, 2002, Akoh CA, Min DB (eds) Marcel Dekker Ltd, NY,

pp: 1-40). Debido a sus propiedades antiinflamatorias, los PUFAs podrían contribuir a mejorar los síntomas en enfermedades como la artritis reumatoide, o el asma (Wijendran y Hayes, 2004, *Annu Rev Nutr.*, 24: 597-615). Además, existen algunos estudios que indican que los PUFAs podrían prevenir o reducir la progresión de ciertos tipos de cáncer (Simopoulos, 2002, *J Am Coll Nutr.*, 21: 495-505; Oh y col., 2005, *Cancer Epidemiol. Biomarkers* 14: 835-841).

Las principales fuentes de EPA (ácido eicosapentaenoico) y DHA (ácido docosahexaenoico) son los aceites de pescado obtenidos habitualmente como subproducto del procesamiento del mismo (Schmitt-Rozieres y col., 2000, *JAOCS.*, 77: 329-332). Estos aceites contienen alrededor de un 30% de PUFAs omega-3 combinados con diferentes ácidos grasos, principalmente en forma de triglicéridos.

Se han desarrollado varios métodos para la purificación de PUFAs a partir de este tipo de aceites mediante métodos químicos o métodos enzimáticos (Shahidi y Wanasundara, 1998, *Trends Food Sci. Technol.*, 9: 230-240). En cuanto a los métodos químicos, mediante cromatografía es posible separar ácidos grasos en función de su número de átomos de carbono así como del grado de insaturaciones que posean, utilizando HPLC o cromatografía con resina de plata (Robles Medina y col., 1998, *Biotechnol. Adv.* 16: 517-580; Shahidi y Wanasundara, 1998, *Trends Food Sci. Technol.*, 9: 230-240). La destilación molecular se ha utilizado para la separación parcial de mezclas de ésteres de ácidos grasos. Este método tiene la ventaja de las diferencias en el punto de ebullición y el peso molecular de estas moléculas bajo una presión reducida (0,1-1,0 mmHg). Un inconveniente que presenta esta metodología es que se requieren elevadas temperaturas (250°C) que favorecen la oxidación, polimerización e isomerización de los dobles enlaces presentes en estos ácidos grasos (Rosu y col., 1998, *J. Mol. Catal. B.*, 4: 191-198; Shahidi y Wanasundara, 1998, *Trends Food Sci. Technol.*, 9: 230-240). Por este motivo, los triglicéridos son transformados en etil o metil ésteres que tienen puntos de ebullición más bajos y pueden ser separados más fácilmente por destilación en vacío. La principal desventaja de este método es el uso de grandes cantidades de disolventes tanto para la reacción como para la separación de los productos.

Otros métodos químicos para concentrar PUFAs omega-3 son la cristalización a baja temperatura y la formación de complejos con urea (Shahidi y Wanasundara, 1998,

Trends Food Sci. Technol., 9: 230-240; Robles Medina y col., 1998, Biotechnol. Adv. 16: 517-580). El primero se basa en las diferencias de solubilidad de las grasas en disolventes orgánicos. Esta solubilidad disminuye cuando se incrementa el peso molecular y aumenta cuando el número de insaturaciones es mayor. Por otro lado, los ácidos grasos saturados de seis o más átomos de carbono forman complejos con urea que precipitan. La formación de estos complejos se dificulta cuando se incrementan el número de insaturaciones presentes en la molécula (Shahidi y Wanasundara, 1998, Trends Food Sci. Technol., 9: 230-240).

Por otro lado, en cuanto a los métodos enzimáticos, en los últimos años diversos investigadores han utilizado lipasas de origen microbiano para producir concentrados de PUFAs omega-3 a partir de la hidrólisis de aceites de pescado. En función del tipo de microorganismos del que proceden, existen lipasas que muestran preferencia por los ésteres de DHA frente a los ésteres de EPA y viceversa (Okada y Morrissey, 2008, J Food Sci., 73: 146-50).

El principal inconveniente del método enzimático es que la actividad de las lipasas microbianas frente a los ésteres de ácidos grasos poliinsaturados es baja debido a los impedimentos estéricos derivados de la estructura de esas moléculas. Ello se debe a la aparición de "codos" en la molécula a causa de los dobles enlaces, de forma que el grupo metilo terminal del ácido graso aparece próximo al enlace éster (Shahidi y Wanasundara, 1998, Trends Food Sci. Technol., 9: 230-240). Los PUFAs EPA y DHA contienen, respectivamente, 5 y 6 insaturaciones en sus cadenas hidrocarbonadas por lo que se dificulta enormemente el acceso de la lipasa al enlace éster entre éstos y el glicerol.

Tanaka y col. (1992, JAOCS 69: 1210-1214) utilizaron seis tipos de lipasas para hidrolizar aceite de atún y comprobaron que la lipasa de *Candida cylindracea* mostraba baja actividad frente a ésteres de DHA, incrementando la concentración de este ácido graso en forma de glicérido, al doble que en el aceite original. Además, en el mismo trabajo, comprobaron que el contenido de EPA en aceite de atún disminuía tras la hidrólisis con las lipasas de *Rhizopus delemar* y *Rhizopus javanicum*.

Shimada y colaboradores (Shimada y col., 1994, JAOCS 71: 951-954; Shimada y col., 1995, JAOCS 72: 1577-1581) hidrolizaron aceite de atún con la lipasa I de

Galactomyces geotrichium logrando incrementar el contenido de EPA y DHA en la fracción no hidrolizada en un 54,5% y 57%, respectivamente. Al realizar este mismo proceso con la lipasa de *C. cylindracea* obtuvieron glicéridos con un 65,6% de DHA y un 34,5% de EPA. El contenido en PUFAs puede enriquecerse, en la fracción de ácidos grasos libres, mediante una esterificación selectiva en presencia de etanol y glicerol, y empleando una lipasa que tenga baja actividad sobre PUFAs en comparación con el resto de ácidos grasos de la mezcla (Shahidi y Wanasundara, 1998, Trends Food Sci. Technol., 9: 230-240; Shimada y col., 2001, J. Biosc. Bioeng., 91: 529-538). Desafortunadamente existen muy pocas lipasas que realicen este proceso de forma eficiente. Algunas lipasas muestran diferente selectividad entre los PUFAs omega-3 y, en general, la actividad suele ser mayor frente a EPA que frente a DHA. Así, las lipasas de *Candida rugosa*, *Rhizopus oryzae* y *Candida lipolytica* discriminan moderadamente a favor del EPA. El origen de esta selectividad podría deberse a los, ya mencionados, impedimentos estéricos (Nagao y col., 1993, J. Biochem., 113: 776-780; Holmquist, 1998, Chem. Phys. Lipids., 93: 57-65). Además, otro estudio realizado mostró que la lipasa de *Bacillus licheniformis* MTCC 6824 aumentaba el contenido en EPA del aceite de sardina de un 46,29 a un 55,38% y el contenido en DHA de un 4,02 a 5,08% considerándola como una fuente potencial de enriquecimiento en PUFAs omega-3 (Chakraborty y Paulraj, 2008, J Agric Food Chem. 56: 1428-33).

Por otra parte la hidrólisis parcial y regioselectiva de azúcares peracetilados presenta un gran interés. Los productos de estas reacciones: azúcares con un único hidroxilo desprotegido son compuestos intermedios de gran importancia farmacéutica (antitumorales, antiinflamatorios, ...) tal como se describe en la patente europea nº ES2267559 (2007). A partir de estos intermedios se puede obtener oligosacáridos diseñados a medida, glicoaminoácidos y glicoconjugados (por ejemplo modificaciones regioselectivas con ácidos grasos), etc, pero la monodesacetilación química de carbohidratos complejos presenta enormes dificultades técnicas debido a su multifuncionalidad, por lo que frecuentemente se tiene que recurrir a largas secuencias de protección-desprotección. El empleo de enzimas en disolventes orgánicos ha contribuido a resolver este problema, por lo que lo ideal sería disponer de diferentes lipasas capaces de desacetilar a diferentes velocidades y en diferentes posiciones

para obtener así una batería de monohidroxiderivados en cada una de las posiciones de un azúcar.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una lipasa que hidroliza distintos sustratos de forma eficiente y solventando los problemas descritos en el estado de la técnica.

Así pues, en un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de la lipasa LipBL para la hidrólisis de distintos sustratos que son seleccionados de entre p-nitrofenoles, tributirina, Tween 80, aceites, sustratos quirales y proquirales, aceite de pescado, azúcares paracetilados o nitrocefín.

Más en particular, la lipasa LipBL se encuentra unida a un soporte, más en particular el soporte es seleccionado de entre octil agarosa, dextrano sulfato, glioxil agarosa, aminoglioxil o bromocianógeno.

En un aspecto más en particular, el sustrato usado en la presente invención es un p-nitrofenol, más en particular, es seleccionado de entre acetato, butirato, octanoato, decanoato, laurato, miristato o palmitato.

En otro aspecto más en particular, el sustrato usado en la presente invención es un sustrato quiral y proquiral, más en particular, es seleccionado de entre dimetil 3-fenil glutarato, metil 3-fenil glutarato, madelato de metilo, ácido 2-O-butirol mandélico, 4-fenil-2-hidroxietilbutirato o hexaacetil lactal.

En otro aspecto más en particular, el sustrato usado en la presente invención es un sustrato beta-lactámico, más en particular, el sustrato beta-lactámico es nitrocefín.

En otro aspecto más en particular, la lipasa LipBL de la presente invención, es activa en un rango de temperatura comprendido entre 5-90°C.

En otro aspecto más en particular, la lipasa LipBL de la presente invención, es activa a pH comprendidos entre 4-9, más en particular, el pH óptimo es 7.

En otro aspecto más en particular, la lipasa LipBL de la presente invención, es activa en un rango salino comprendido entre 0-3 M de NaCl.

La presente invención proporciona además, una metodología enzimática para la obtención de una monodesprotección regioselectiva de un precursor de un disacárido peracetilado en su posición primaria de gran interés en la industria farmacéutica por la síntesis de glicoconjugados de alto valor añadido como es el caso de los ésteres con ácidos grasos de los disacáridos, que pueden presentar actividades insecticidas, antibióticas y antitumorales dependiendo de la estructura del disacárido y del ácido graso utilizado (Plou y col., 2002, J. Biotechnol., 96: 55-66).

Así pues, en un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la monodesprotección regioselectiva de azúcares paracetilados para la obtención de azúcares monodesacetilados caracterizado porque la monodesprotección regioselectiva de dichos azúcares es llevada a cabo enzimáticamente mediante la lipasa LipBL. En un aspecto más en particular, el azúcar peracetilado es un disacárido peracetilado, más en particular, el azúcar monodesacetilado es el hexaacetil lactal.

En otro aspecto más en particular, el azúcar monodesacetilado obtenido en el procedimiento de la presente invención es el 3, 6, 2', 3', 4'-penta-O-acetil lactal.

En otro aspecto más en particular, la lipasa LipBL está unida a un soporte seleccionado de entre octil agarosa, dextrano sulfato, glioxil agarosa, aminoglioxil o bromocianógeno.

En otro aspecto más en particular, la lipasa LipBL de la presente invención, es activa en un rango de temperatura comprendido entre 5-90°C.

En otro aspecto más en particular, la lipasa LipBL de la presente invención, es activa a pH comprendidos entre 4-9, más en particular, el pH óptimo es 7.

En otro aspecto más en particular, la lipasa LipBL de la presente invención, es activa en un rango salino comprendido entre 0-3 M de NaCl.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Muestra el ensayo en papel de filtro con MUF-butilato para detectar la actividad lipolítica de las distintas fracciones celulares de la bacteria halófila moderada *Marinobacter lipolyticus*, a) membrana, b) periplasma y c) citoplasma

Figura 2: Zimograma de la fracción intracelular de *Marinobacter lipolyticus* (Gel SDS-PAGE 10%) para determinar el número de lipasas intracelulares responsables de la actividad lipolítica.

Figura 3: Esquema del clon pFP formado por el vector pBC KS+ y el gen *lipBL*. A partir de este clon se llevó a cabo la purificación de la lipasa LipBL.

Figura 4: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de LipBL. Los cuadros indican los motivos típicos de la familia VIII de las lipasas. El primer motivo resaltado con un cuadro con líneas continuas, es común con el motivo típico de la clase C de la beta-lactamasas y el segundo motivo resaltado con un cuadro con líneas discontinuas es el pentapéptido típico de las lipasas.

Figura 5: Gel SDS-PAGE 12% que muestra el resultado de la purificación de LipBL a partir del clon pFP. 1. Marcador de pesos moleculares; 2. Extracto crudo del clon pFP; 3. LipBL pura.

Figura 6: Ensayo de MALDI-TOF de la enzima LipBL. Se llevó a cabo mediante el análisis de los fragmentos resultantes tras la digestión con tripsina de LipBL tras la purificación a partir del clon pFP. La secuencia de LipBL que coincide con esos fragmentos es la secuencia subrayada.

Figura 7: Muestra el efecto de la temperatura y termoestabilidad de LipBL. a) Efecto de la temperatura en la actividad de LipBL. LipBL soluble (rombos) y derivado LipBL-octil agarosa (cuadrados). b) Termoestabilidad de LipBL soluble a distintas temperaturas a lo largo del tiempo.

Figura 8: Efecto del pH y cloruro sódico sobre LipBL. a) Efecto del pH a 25°C en la actividad de LipBL. LipBL soluble (negro) y derivado LipBL-octil agarosa (blanco). Para los experimentos de estabilidad, se utilizaron diferentes tampones a una concentración de 50 mM según el valor de pH ensayado: tampón acetato sódico (triángulos), tampón fosfato sódico (cuadrado) y tampón bicarbonato sódico (círculos) b) Efecto de la concentración de NaCl en la actividad de LipBL. LipBL soluble (rombos) y derivado LipBL-octil agarosa (cuadrado).

Figura 9: Muestra el efecto de diferentes detergentes sobre la lipasa LipBL soluble.

Figura 10. Ensayo en placa para detectar la actividad de LipBL sobre distintos sustratos. a) Actividad del clon pFP en placa de tributirina; b) Actividad del clon pFP en placa de Tween 80; c) Actividad del clon pFP en aceite de oliva.

Figura 11. Actividad de LipBL sobre sustratos cromogénicos (p-nitrofenoles) con diferentes longitud de cadena (acetato, C2; butirato, C4; caprilato, C8; decanoato, C10; laurato, C12; miristato, C14 y palmitato, C16).

Figura 12. Actividad beta-lactamasa de LipBL frente a nitrocefín utilizando como control positivo la beta-lactamasa de *Bacillus cereus* y como control negativo la lipasa de *Chromobacterium viscosum*.

Figuras 13: Hidrólisis asimétrica del compuesto 1 (dimetil-3-fenilglutarato) por derivados de LipBL.

Figura 14: Hidrólisis enantioselectiva del compuesto 4 (mandelato de metilo) por derivados de LipBL.

Figura 15: Hidrólisis enantioselectiva del compuesto 5 (ácido 2-O-butyioil mandelico) por derivados de lipBL.

Figura 16: Hidrólisis enantioselectiva del compuesto 7 (4-fenil-2-hidroxietilbutirato) por derivados de LipBL.

Figura 17: Hidrólisis regioselectiva del compuesto 9 (hexaacetil lactal) por derivados de LipBL.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La enzima lipolítica denominada LipBL fue aislada de la bacteria halófila *Marinobacter lipolyticus* SM19 (Martín y col., 2003, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 1383-1387). Esta enzima presentó su óptimo de actividad a pH 7,0, 37°C y ausencia de cloruro sódico, aunque fue capaz de actuar manteniendo un 20% de actividad residual hasta 3 M de cloruro sódico, y fue estable en una amplia batería de disolventes orgánicos ensayados (tabla 1), por lo que se garantiza su utilización en diferentes procesos industriales.

Tabla 1. Efecto de diferentes solventes orgánicos en la actividad de LipBL frente a p-NPB.

Solventes orgánicos	Actividad residual (%) ^a
Dimetilsulfoxido (DMSO) (30%)	97.5
N,N-dimetilformamida (30%)	98.3
Metanol (30%)	120.5
Acetonitrilo (30%)	27.7
Etanol (30%)	107.8
Acetona (30%)	91.3
2-Propanol (30%)	98.4
1-Propanol (30%)	35.1
Dietileter (30%)	115.1
Tolueno (5%)	104.8
Hexano (5%)	94.1

^a La actividad lipasa residual hacia p-nitrofenil butirato se midió tras 30 minutos de incubación con el solvente.

Con el fin de determinar la localización subcelular de dicha actividad en *M. lipolyticus* se llevó a cabo el fraccionamiento de las distintas fracciones celulares y se realizó un ensayo con MUF-butirato en papel de filtro, observando que la fracción responsable de la actividad fue la intracelular. Una vez localizada la actividad, se realizó un zimograma en un gel SDS-PAGE para determinar el número de lipasas intracelulares responsables de dicha actividad observándose la presencia de dos lipasas intracelulares.

El aislamiento de uno de los genes (*lipBL*) responsable de la actividad lipolítica se llevó a cabo mediante la construcción de una genoteca en *Escherichia coli* y posterior screening para la búsqueda de clones con actividad lipolítica sobre tributirina, obteniendo un cósmido con actividad lipolítica que contenía dicho gen. Este gen fue clonado en el vector plasmídico pBC KS+ y al conjunto se la denominó clon pFP. El gen *lipBL* consta de 1215 nucleótidos (SEQ ID NO: 1) que codifica una proteína de 404 aminoácidos (SEQ ID NO: 2) y 45 kDa a la que denominamos LipBL.

LipBL se purificó a partir del clon pFP mediante la combinación de soportes hidrofóbicos, de intercambio iónico y quelatos. Además se estudió la estabilidad de LipBL en distintos solventes orgánicos, observándose que LipBL permanecía estable en la mayoría de los solventes ensayados (Tabla 1). Por otro lado, los detergentes que produjeron un incremento del 20% de la actividad enzimática fueron el Tritón X-100 y el laurato de sacarosa. LipBL hidroliza tributirina, Tween-80, aceite de oliva y un amplio abanico de p-nitrofenoles, aunque muestra mayor especificidad por p-nitrofenoles de corta a media longitud de cadena.

De cara a sus aplicaciones industriales, LipBL hidrolizó el aceite de pescado produciendo un aumento en la cantidad de EPA (ácido eicosapentaenoico) y DHA (ácido docosahexaenoico) presentando una clara predilección por la formación de EPA, siendo el derivado bromocianógeno el más efectivo.

En cuanto a la hidrólisis de sustratos quirales y proquirales, hidrolizó todos los sustratos ensayados a una gran velocidad, pero ningún derivado mostró una gran enantioselectividad hacia ninguno de ellos, sin embargo el derivado glioxil de esta enzima fue altamente regioselectivo frente al hexaacetil lactal con un 75% de rendimiento dando lugar al producto monodesacetilado en la posición 6 de la porción galactosídica, el cual es un producto intermedio de gran interés en la industria farmacéutica para la síntesis de glicoconjugados de alto valor añadido.

Este producto intermedio monodesacetilado, sería difícil de obtener mediante reacciones químicas, debido a lo tedioso que sería llevar a cabo la protección del resto de grupos acetilos.

Ejemplo 1: Determinación de las condiciones óptimas de cultivo de *Marinobacter lipolyticus* para la máxima producción enzimática

Marinobacter lipolyticus SM19 es una bacteria halófila aislada y caracterizada por nuestro grupo como una nueva especie (Martín S. y col., 2003, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:1383-1387) y está depositada en cuatro colecciones de cultivo: DSM 15157^T = NCIMB 13907^T = CIP 107627^T = CCM 7048^T.

Esta bacteria halófila es capaz de crecer en un rango salino comprendido entre un 1 y un 15% de sales totales; estimándose un rango salino óptimo de crecimiento para esta

cepa comprendido entre 7,5 y 10% de sales, en medio SW a 37°C. SW es un medio que se obtiene a partir de un stock al 30% de sales (NaCl: 234,0 g; MgCl₂·6H₂O: 39,0 g; MgSO₄·7H₂O: 61,0 g; KCl: 6,0 g; NaBr: 0,7 g; NaHCO₃: 0,2 g; CaCl₂·2H₂O: 1,0 g; Agua destilada c.s.p. 1000 ml) suplementado con un 0,5% de extracto de levadura. No se observa crecimiento ni en ausencia de sales ni en concentraciones superiores al 15% de sales; el crecimiento tanto al 1% como al 15% de sales es muy lento y no se alcanzan valores elevados de D.O. Una vez establecida la concentración de sales óptima para el crecimiento de la cepa, se determinó la temperatura óptima de crecimiento en 37°C, siendo capaz de crecer en un intervalo comprendido entre 15 y 40°C; determinándose también el rango de valores de pH al cual es capaz de crecer (5,0-10,0), presentando un crecimiento óptimo a pH 7,5.

Estos datos se utilizaron como base para el estudio de las condiciones de cultivo que daban lugar a una mayor producción enzimática. En primer lugar, se estudió el efecto de la adición al medio de cultivo de diferentes sustratos, tales como tributirina, aceite de oliva o hexadecano en la actividad lipolítica de la cepa SM19; comprobándose que la actividad lipolítica de la cepa no se veía influenciada por la adición al medio de cultivo de sustratos específicos de este tipo de enzimas. Por otra parte, se estudió el efecto de la aireación del medio de cultivo en la actividad enzimática. Así, en matraces de 250 ml se inocularon volúmenes de medio de cultivo comprendidos entre 50 y 100 ml; observándose que la actividad enzimática sí se veía afectada por la oxigenación, determinándose que con una aireación entre 3 y 5 veces mayor al volumen del cultivo se obtenían los máximos valores de actividad enzimática.

De esta forma se determinó que las condiciones de cultivo que permiten el crecimiento óptimo de *M. lipolyticus*, y por tanto la obtención de la mayor biomasa, coinciden con las condiciones óptimas de cultivo para la producción de la mayor actividad lipolítica. Estas condiciones fueron: medio complejo SW-7,5, temperatura de incubación de 37°C, pH 7,5, periodo de incubación de al menos 12 horas (fase exponencial tardía de crecimiento) y una aireación entre 3 y 5 veces mayor al volumen del cultivo.

Ejemplo 2. Localización subcelular y número de enzimas responsables de la actividad lipolítica en *Marinobacter lipolyticus*

Para confirmar la localización subcelular de la actividad lipolítica, se llevó a cabo un ensayo con el sustrato cromogénico MUF-butirato en papel de filtro. Para llevar a cabo el fraccionamiento subcelular, se tuvo en cuenta el siguiente protocolo:

Sobrenadante: El sobrenadante procedente de los distintos cultivos se obtuvo a partir de 100 ml del mismo tras incubarlo durante 16 horas. El cultivo bacteriano se centrifugó a 3.500 *g* y 4°C durante 10 minutos en una centrifuga refrigerada, recogiendo el sobrenadante libre de células. Cuando no se procedió al ensayo inmediato de la actividad hidrolítica, las muestras se conservaron a -20°C, previa adición de CaCl₂ a una concentración de 1 mM y PbSC (PefablocSC, Boehringer Ingelheim), un potente inhibidor de proteasas a una concentración de 10 µg/ml.

Fracción periplásmica: Para la obtención de la fracción periplásmica, el precipitado obtenido tras la anterior centrifugación se resuspendió en 250 microlitros de tampón A y 250 microlitros de tampón B y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se centrifugó durante 20 minutos a 10.000 *g* y se recogió el sobrenadante obtenido, el cual correspondía a la fracción periplásmica.

Al igual que en el caso de las muestras de sobrenadante, las fracciones periplasmáticas se conservaron a -20° C, adicionadas de CaCl₂ (1 mM) y PbSC (10 µg/ml).

Fracción citoplasmática: La fracción citoplasmática se obtuvo por tratamiento de las células con ultrasonidos utilizando un sonicador. Para ello, las células obtenidas tras recoger la fracción periplasmática, se resuspendieron en 500 microlitros de tampón C y se sonicó durante 4 minutos. Posteriormente, se volvió a centrifugar a 14.000 *g* durante 1 hora, y se recogió el sobrenadante obtenido, conteniendo las proteínas citoplasmáticas.

Fracción de la membrana: El sedimento obtenido de la anterior centrifugación, correspondiente a las proteínas contenidas en las membranas celulares, se resuspendió en 500 microlitros de tampón C.

Tampón A: 100 mM de Tris-HCl, 20% (p/v) sacarosa. Ajustar el pH a 8.

Tampón B: 100 mM de Tris-HCl, 5 mM de EDTA. Ajustar el pH a 8.

Tampón C: 100 mM de Tris-HCl. Ajustar el pH a 8.

Para la detección de actividad a partir de las fracciones celulares de *M. lipolyticus* se utilizó como sustrato el MUF-butirato (4-metilumbeliferona) en papel de filtro. Para ello se tomaron 5 microlitros de cada fracción y se colocaron en un papel de filtro, adicionando a continuación sobre la gota de cada fracción otros 5 microlitros de una solución stock 25 mM de MUF-butirato en etilenglicol monometil eter. Pasados unos 30 segundos se llevó a cabo la exposición del papel de filtro a luz ultravioleta bajo la cual, las fracciones con actividad lipolítica emiten fluorescencia.

Este ensayo mostró que la fracción responsable de la actividad era la intracelular (Figura 1).

Una vez determinada la localización subcelular de las enzimas, se procedió a la determinación del número de enzimas responsables de esta actividad lipolítica mediante la realización de un zimograma a partir de un gel SDS-PAGE al 10% que se realizó a 120 V durante aproximadamente 1 hora. Las muestras que se cargaron en el gel no se hirvieron, a diferencia del caso de los geles SDS-PAGE convencionales (Díaz y col., 1999, Biotechniques, 27: 696-698). Una vez finalizada la electroforesis, se llevan a cabo los siguientes pasos:

En primer lugar, se lavó el gel durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución al 2,5% de Tritón X-100. Transcurrido este tiempo, se eliminó la solución y se volvió a lavar el gel durante un minuto con 50 ml de tampón fosfato sódico 50 mM a pH 7. Tras lavar, se eliminó la solución y se adicionó 50 ml de tampón fosfato sódico, 50 mM a pH 7 y 200 microlitros de MUF-butirato 25 mM en etilenglicol monometil eter. Se incubó en agitación durante 5 minutos pasados los cuales se procedió a exponer el gel a luz ultravioleta. El lugar donde se encuentren las proteínas con actividad lipolítica emitirá fluorescencia. Posteriormente, y antes de teñir el gel con azul brillante de Coomassie, se lavó de nuevo durante 5 minutos con tampón fosfato sódico 50 mM a pH 7.

De este ensayo se dedujo, que el número de enzimas responsables de la actividad eran dos (Figura 2).

Ejemplo 3. Aislamiento del *gen lipBL* responsable de la actividad lipolítica de *M. lipolyticus*

El gen responsable de esta actividad lipolítica en *Marinobacter lipolyticus* se aisló mediante la construcción de una genoteca a partir de la cual, y tras un proceso de screening se aisló uno de los cósmidos (pSM9) con actividad. A partir de este cósmido se llevó a cabo la clonación del gen responsable de la actividad en el vector pBC KS(+) (cloranfenicol resistente) constituyendo el clon pFP (Figura 3) que se transformó en *E. coli* DH5 y se creció en el medio de cultivo LB (Bacto-triptona (Difco): 10 g; Extracto de levadura (Difco):5 g; NaCl (Panreac):10 g; Agua destilada c.s.p. 1000 ml; ajustar el pH a 7,2) suplementado con el antibiótico correspondiente. Al gen responsable de esta actividad lipolítica intracelular se le denominó *lipBL*.

A partir de la secuenciación de dicho gen, obtuvimos la secuencia que fue analizada mostrando una alta homología con la clase C de las beta-lactamasas además de presentar el motivo típico de la familia VIII de lipasas descritas por Arpigny y Jaeger (1999, Biochem J., 343: 177-183). El motivo típico de estas dos familias de enzimas coincide, estando formado por un residuo de serina, dos aminoácidos variables y un residuo de lisina (S-X-X-K) (figura 4). Por tanto cabría esperar una doble actividad lipasa-beta lactamasa. Este gen consta de 1215 nucleótidos, 404 aminoácidos, y el peso estimado es de 45 kDa. Además LipBL presenta próximo al carboxilo terminal el pentapéptido conservado típico de las lipasas que se muestra en la figura 4.

Ejemplo 4. Procedimiento para la purificación de LipBL a partir del clon pFP

Con el objetivo de purificar la enzima se procedió a obtener la fracción intracelular de *E. coli*. Para extraer dicha fracción se resuspendió el sedimento de células obtenido tras un proceso de centrifugación en tampón fosfato 50 mM y se procedió a la rotura de las mismas mediante el uso de una Prensa French, la cual rompe las células por presión hidrostática. Una vez rotas las células se volvió a centrifugar para separar los restos de pared celular (sedimento) del contenido proteico intracelular (sobrenadante). Para la conservación de la fracción intracelular, al sobrenadante obtenido se le

adicionó benzamidina 3 mM (Sigma) como inhibidor de proteasas y azida sódica (Sigma) al 0,1-0,2% para evitar el crecimiento de otros microorganismos.

A partir del clon pFP, se consiguió su purificación siguiendo el protocolo que se detalla a continuación. Con este procedimiento se consigue una purificación de LipBL con un rendimiento del 60% y un factor de purificación superior a 100 (Figura 5). Con el objeto de comprobar que la banda obtenida en el gel correspondía con LipBL, se le realizó un MS-MALDI-TOF usando la base de datos MASCOT, obteniéndose resultados positivos (Figura 6).

La localización de la lipasa en cada momento (soporte o sobrenadante), se determinó mediante la medida del incremento de absorbancia a 348 nm utilizando como sustrato p-nitrofenil butirato.

- i) Primero, el extracto crudo de *Escherichia coli* que contenía la enzima recombinante se incubó con un exceso de sulfopropil agarosa (30 mg/ml de proteínas) al cual LipBL no se adsorbía. El sobrenadante resultante, se ofreció a dextrano-sulfato agarosa al cual se adsorbió la enzima. Este soporte con la enzima adsorbida, se lavó con 100 mM de cloruro sódico con el fin de eliminar otras proteínas. Finalmente, la enzima fue desorbida con 350 mM de cloruro sódico.
- ii) El sobrenadante obtenido tras desorber la enzima desde el dextrano-sulfato agarosa, se ofreció a un soporte quelato IDA (ácido iminodiacético)-Cu altamente activado (conteniendo 20 μ Eqs de quelatos por gramo de gel agarosa 4%) al cual la enzima se adsorbía. Este soporte se lavó con 50 mM de imidazol para la eliminación de proteínas contaminantes. La enzima, fue entonces desorbida con 100 mM de imidazol a una fuerza iónica de 150 mM de cloruro sódico. El sobrenadante obtenido fue dializado frente a tampón fosfato 10 mM pH 7. Las membranas de diálisis usadas fueron de Medicell internacional Ltd (Dialysis Tubing MWCO: 12-14,000 Daltons; Size 6; 27/32"; 21,5 mm).
- iii) La enzima dializada se adsorbió en octil agarosa y el complejo, se lavó en presencia de 0,1% de Tritón X-100 (más del 80% de la enzima quedó retenida aún en el soporte) y se eliminaron impurezas. Finalmente, la enzima fue desorbida a una concentración de 0,3% de Tritón X-100.

Ejemplo 5. Construcción de derivados enzimáticos

Con el objetivo de conseguir derivados estables de la enzima se construyeron derivados de LipBL utilizando como soportes: bromuro de cianógeno activado, glioxil agarosa, amino-glioxil agarosa, dextrano sulfato y octil agarosa. En todos los casos, la solución enzimática se mezcló con cantidades específicas de los diferentes soportes a los valores de pH óptimos para cada proceso. Para ver el grado de inmovilización de la enzima en cada soporte, se tomaron pequeñas alícuotas de sobrenadante (solución enzimática) y de suspensión (solución enzimática-soporte) y se determinó la localización de la enzima mediante la medida del incremento de la absorbancia utilizando como sustrato el p-NPB.

-Preparación de los derivados octil agarosa, dextrano sulfato y sepharosa Q

Para la preparación de dichos derivados, se mezcló la solución enzimática con el soporte de interés y se incubó a temperatura ambiente y agitación orbital hasta que la enzima se hubo adsorbido al soporte.

-Preparación del derivado bromocianógeno

Para la preparación del derivado bromocianógeno se utilizó el soporte bromuro de cianógeno activado. Para activarlo, se resuspendió en agua destilada y se ajustó el pH a 2, se dejó en agitación orbital en un agitador de rodillos (Movil-Rod P-Selecta) 1 hora y luego se lavó con tampón fosfato sódico 10 mM a pH 8. Una vez activado y lavado el soporte se le adicionó el extracto crudo del clon pFP, se ajustó el pH a 8 y se mantuvo durante 15 minutos a 4°C y con agitación magnética. Una vez unido al soporte el 30% ó más de la cantidad total de lipasa, se filtra la suspensión formada por el soporte y el extracto crudo. Una vez filtrado, se separa el soporte el cual lleva unido la lipasa y se procede a la inactivación del derivado con etanolamina (Sigma) 1M pH 8 durante 2 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se vuelve a filtrar la suspensión y se lava el soporte con agua destilada varias veces.

-Preparación del derivado glioxil agarosa

Para la preparación del derivado glioxil, se utilizó el soporte glioxil agarosa 6 BCL el cual se mezcló con el extracto crudo diluido con tampón bicarbonato sódico 0,1 M a pH 10. La inmovilización se llevó a cabo durante toda la noche a temperatura

ambiente. Una vez adsorbida la mayor parte de la enzima, el derivado obtenido se bloqueó con borohidruro de sodio (Sigma-Aldrich) adicionando 1 mg de éste por cada ml de suspensión de derivado. El proceso se llevó a cabo con agitación magnética durante 30 minutos y el frasco abierto, debido al desprendimiento de gas hidrógeno. Posteriormente se filtró la suspensión y el derivado obtenido se lavó con agua destilada varias veces.

-Preparación del derivado amino-glioxil agarosa

Para la preparación del derivado heterofuncional amino-glioxil agarosa, primero se expuso la solución enzimática al mismo y una vez adsorbida la enzima se filtró la mezcla para obtener el soporte con la enzima adsorbida a los grupos aminos. Posteriormente, se adicionó tampón bicarbonato sódico 5 mM pH 10 para activar entonces los grupos glioxil. Se incubó el mayor tiempo posible (en este caso 2 horas). El derivado obtenido se bloqueó con borohidruro de sodio (Sigma-Aldrich) adicionando 1 mg de éste por cada ml de suspensión de derivado. El proceso se llevó a cabo con agitación magnética durante 30 minutos y el frasco abierto, debido al desprendimiento de gas hidrógeno. Posteriormente se filtró la suspensión y el derivado obtenido se lavó con agua destilada varias veces.

Ejemplo 6. Caracterización bioquímica de LipBL

Todos los ensayos realizados a continuación se llevaron a cabo usando el p-NPbutirato como sustrato.

Influencia de la temperatura, pH y NaCl

Una vez purificada la enzima, para estudiar la influencia de la temperatura, el pH y la concentración de NaCl, se utilizó la enzima soluble y el derivado octil de la misma. La influencia de la temperatura en la hidrólisis de p-NPB por LipBL se ensayó en un amplio rango (5-90°C) manteniendo un valor de pH de 7, en cuanto al pH, el rango ensayado fue de 2 a 9 manteniendo la temperatura a 25°C y para determinar la influencia del NaCl el rango ensayado fue de 0 a 3 M, manteniendo un valor de pH de 7 y la temperatura a 25°C.

El perfil de termoestabilidad se realizó incubando la enzima soluble a varias temperaturas (25°C, 37°C, 50°C, 60°C), seguido de la medida de actividad residual a

diferentes tiempos usando el ensayo estándar de lipasa. De estos ensayos se dedujo que LipBL es estable en un amplio rango de temperaturas (presentando actividad máxima a 80°C) (Figura 7a), y valores de pH (siendo el óptimo pH 7) (Figura 8a) y es más estable en ausencia de cloruro sódico, sin embargo, mantiene un 20% de actividad relativa hasta un rango de 3 M de esta sal (Figura 8b). De la curva de termoestabilidad se deduce que LipBL presenta su máxima estabilidad a 37°C (Figura 7b). El derivado octil presenta incrementados sus valores de estabilidad.

Influencia de distintos solventes orgánicos

Por otro lado, para el estudio del efecto de los solventes orgánicos en la estabilidad de la enzima pura soluble, se expuso LipBL a diferentes compuestos que normalmente se utilizan en reacciones de hidrólisis: dimetil sulfoxido (DMSO), N,N-dimetilformamida, metanol, acetonitrilo, etanol, dietileter, acetona, 1-propanol, 2-propanol, (al 30% en tampón fosfato sódico 25 mM pH 7) y tolueno y hexano (al 5% en tampón fosfato sódico 25 mM pH 7). El ensayo se llevó a cabo a la temperatura de 25°C con agitación orbital durante 30 minutos. Como control negativo, se utilizó la enzima soluble en ausencia de solventes bajo las mismas condiciones experimentales. LipBL resultó ser estable en todos los solventes orgánicos ensayados (Tabla 1).

Efecto de distintos detergentes

Debido al fenómeno de hiperactivación que suelen producir los detergentes sobre algunas lipasas, se ensayó el efecto de concentraciones crecientes de distintos detergentes sobre LipBL, observándose que sólo el Tritón X-100 y el laurato de sucrosa producen una pequeña hiperactivación a una baja concentración (0,001%) (Figura 9).

Ejemplo 7. Hidrólisis de diferentes sustratos

-Tributirina

Para el estudio de la actividad lipolítica cualitativa, se adicionó tributirina al medio base. La tributirina al tratarse de un triacilglicerol, es insoluble en agua y para la elaboración del medio fue necesario su sonicación durante al menos 10 minutos con el fin de conseguir una adecuada homogeneización. Para ello, se utilizó un sonicador Labsonic (Braun Biotech International). Las placas se incubaron a 37°C durante 2 días,

tras los cuales se observó un halo de hidrólisis alrededor del crecimiento del clon pFP (Figura 10a)

-Tween 80

Se adicionó Tween 80 a una concentración del 1%. La presencia de actividad lipolítica dio lugar a la aparición de un precipitado alrededor de las colonias como consecuencia de la reacción entre el CaCl_2 y los ácidos grasos liberados por la hidrólisis del Tween 80 (Cowan y Steel, 1982, CECOSA: México) (Figura 10b).

-Aceite de oliva

Para la detección de la hidrólisis del aceite de oliva, se llevó a cabo un ensayo en placa. El medio utilizado fue LB al que se le adicionó 1-2% de aceite de oliva y 0,001% de rodamina B. El aceite de oliva fue mezclado con 3 ciclos de sonicación de 10 minutos cada uno al 100% de potencia (Labsonic, Braun Biotech International). El pH del medio se ajustó a 7,4 y se esterilizó (121°C, 20 min). En caso de hidrólisis se observa fluorescencia al exponerlo a la luz UV (Figura 10c).

Por tanto, tras la observación de estas placas se concluye que LipBL hidroliza todos los sustratos anteriormente citados.

A continuación se procedió a estudiar la especificidad de sustrato, para ello se utilizaron para-nitrofenoles de distinta longitud de cadena (acetato, C2; butirato, C4; octanoato, C8; decanoato, C10; laurato, C12; miristato, C14 y palmitato, C16). Una vez extraída la fracción intracelular como se describe en el apartado 2 se procedió al ensayo enzimático siguiendo el siguiente protocolo:

Se mezcló en un eppendorf: 100 microlitros de fracción intracelular del clon pFP, 800 microlitros de tampón fosfato 0,05 M pH 7,2 y 100 microlitros de sustrato 5 mM.

Se incubó a 37°C durante 20 minutos en agitación. Y se midió el incremento de absorbancia a 405 nm.

Una unidad internacional enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μmol de sustrato por minuto bajo las condiciones descritas anteriormente (Bastida y col., 1998).

La actividad, en unidades internacionales por mililitro (UI/ml), se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$A = \frac{\text{Abs/min} \times V_c \times 1000}{C_e \times V_e}$$

Ce x Ve

A = actividad (UI/ml)

Abs/min = Absorbancia por minuto (348-420 nm)

Vc = volumen total de la cubeta

Ce = coeficiente de extinción molar (5150)

Ve = volumen de solución enzimática

Los resultados obtenidos tras este ensayo indicaron que LipBL mostró mayor especificidad por sustratos de corta a media longitud de cadena pero que también hidrolizó, aunque en menor medida, sustratos de mayor longitud de cadena (Figura 11). La actividad específica calculada para el p-nitrofenil butirato fue de 55 U/mg.

Con el fin de estudiar la enantioselectividad de la enzima, se utilizaron los diferentes derivados enzimáticos realizados (apartado 5): dextrano sulfato, bromocianógeno, glioxil, amino-glioxil y octil agarosa.

Ejemplo 8: Hidrólisis enzimática de ésteres

El sustrato dimetil 3-fenilglutarato (compuesto 1), se disolvió en tampón fosfato sódico 10 mM a 25°C y diferentes valores de pH. Por cada 5 ml de esta solución se añadió 0,25 g de derivado. Durante la reacción, el valor del pH se mantuvo constante usando un pH-stat Mettler Toledo DL50. El grado de hidrólisis se analizó por HPLC de fase reversa (Spectra Physic SP 100 acoplado con un detector UV Spectra Physic SP8450). Para este ensayo, se utilizó una columna Kromasil C18 (25x0,4 cm) y una fase móvil de acetonitrilo y 10 mM de tampón fosfato (35-65%, v/v) a un pH final de 3. La detección mediante luz UV en este caso se llevó a cabo a 225 nm. La unidad de

actividad enzimática se definió como micromoles de sustrato hidrolizado por minuto y por mg de proteína inmovilizada (figura 13).

A continuación se determinó el exceso enantiomérico del metil 3-fenilglutarato (compuesto 2). El exceso enantiomérico de dicho compuesto, (a un porcentaje de conversión de un 15 a un 30%) se analizó por HPLC quiral de fase reversa. La columna usada fue Chiracel OD-R y la fase móvil una mezcla isocrática de acetonitrilo-tampón fosfato amónico 10 mM (25:75, v/v) a pH 3. La detección de los compuestos, fue llevada a cabo a 225 nm (figura 13).

El sustrato (+)-mandelato de metilo (compuesto 4) se disolvió en 3 ml de tampón fosfato sódico 10 mM para una concentración final de 2 mM de sustrato a 25°C y pH 7 bajo diferentes condiciones (pH y temperatura), adicionando 0,6 g de derivado de LipBL (figura 14). El sustrato ácido 2-O-butirol mandélico (compuesto 5) se disolvió en 3 ml de solución 10 mM de buffer fosfato sódico para una concentración final de 0,5 mM de sustrato y se le adicionó 0,5 g de derivado (figura 15).

Otro sustrato usado fue el 4-fenil-2-hidroxietilbutirato (compuesto 7), que se disolvió en 3 ml de tampón fosfato sódico 10 mM para una concentración final de 2 mM a 25°C y pH 7,5 bajo diferentes condiciones (pH, temperatura), a la mezcla se añadió 0,1 g de derivado (figura 16).

Durante la reacción, el pH se mantuvo constante mediante el uso de pH-stat Mettler Toledo DL50. La actividad enzimática fue definida como micromol de sustrato hidrolizado por minuto y por mg de proteína inmovilizada. El grado de hidrólisis se analizó mediante HPLC de fase reversa (Spectra Physic SP 100 acoplado con un detector UV Spectra Physic SP 8450). Para el sustrato ácido 2-O-butirol mandélico, se utilizó una columna Kromasil C18 (25x0,4 cm) usando como fase móvil acetonitrilo-tampón fosfato amónico a pH 2,95 en una proporción 35:65 (v/v), para el mandelato de metilo, se usó la misma columna con la misma fase móvil pero a la proporción 30:70 (v/v) y para el 4-fenil-2-hidroxietilbutirato se usó la proporción 40:60 (v/v). La detección mediante luz UV, se llevó a cabo a 254 nm para los sustratos 2-O-butirol mandélico y mandelato de metilo y a 270 nm para el sustrato 4-fenil-2-hidroxietilbutirato.

Determinación del exceso enantiomérico y enantioselectividad: El exceso enantiomérico (ee) calculado a un porcentaje de conversión entre 10 y 15% para cada

sustrato, se analizó mediante HPLC quiral de fase reversa. La columna usada fue Chiracel OD-R y la fase móvil, una mezcla de acetonitrilo y $\text{NaClO}_4/\text{HClO}_4$ 0,5 M en una proporción 5:95 (v/v) para los compuestos 4 y 5 y 20:80 v/v para el compuesto 7 a un pH final de 2,3 y un flujo de 0,5 ml/min. La detección mediante luz UV se llevó a cabo a 225 nm. La enantioselectividad se calculó usando la ecuación de Chen et al. (1982) (figuras 14, 15 y 16).

En primer lugar, se ensayaron los diferentes sustratos quirales y proquirales citados anteriormente (ácido 2-O-butirol mandélico, mandelato de metilo, dimetil-3-fenil glutarato, 4-fenil-2-hidroxietilbutirato) con el derivado dextrano sulfato con el que no se observó una enantioselectividad significativa, aunque hidrolizó todos los sustratos ensayados (tabla 2).

Tabla 2. Hidrólisis de diferentes sustratos quirales y proquirales con el derivado LipBL-dextrano sulfato.

^a[sustrato]: 1 mmol, biocatalizador (0.2g), NaH_2PO_4 2 mL, 25°C.

^b[sustrato]: 10 mmol, biocatalizador (0.2g), NaH_2PO_4 2 mL, 25°C.

Sustrato	pH	Tiempo (h)	Conversión (%)	Vh (UI/g *10 ⁻²) ^c	Activ. específica ^d	E ^e
Ácido 2-O-butirol mandélico ^a	7	0,75	100	40	0,85	S-1,2
	5	0,5	100	nd	nd	nd
Mandelato de Metilo ^b	7	24	17	1,18	0,025	R-1.43
Dimetil-3-fenil glutarato ^a	7	18	75	2	0,042	R-2,3
4-Fenil-2-hidroxietilbutirato ^a	7	0,5	100	32	0,68	1

^cVelocidad de hidrólisis calculada a un 15-30% de rendimiento.

^dActividad calculada por cada Unidad pNPB / g derivado.

^eEnantioselectividad

El sustrato frente al que LipBL mostró una mayor enantioselectividad fue el dimetil-3-fenil glutarato, por lo que éste se probó con diferentes derivados (tabla 3).

Tabla 3. Hidrólisis del dimetil-3-fenil glutarato con diferentes derivados de LipBL.

Derivado	Conversión (%)	Vh (U/g *10 ²) ^c	Actividad específica ^d	Monoéster (%)	Di-Acido (%)	E ^e
BrCN ^a	68	22	1,74	66,5	1,5	R-2,2
Glioxyl ^a	67	20	1,52	65	2	R-2,3
Glioxyl Amino ^a	33	6,3	1,1	32	1	R-2,1
Octil ^b	75	38	1,6	71	4	R-2,2

^a[DMFG]: 1 mmol, biocatalizador (0.5g), NaH₂PO₄ 2 mL, pH 7, 25°C, 24h

^b[DMFG]: 1 mmol, biocatalizador (0.32g), NaH₂PO₄ 2 mL, pH 7, 25°C, 24h

^cVelocidad de hidrólisis calculada a un 15-30% de rendimiento.

^dActividad calculada por cada Unidad pNPB / g derivado.

^eEnantioselectividad

Los resultados obtenidos, indicaron que la unión de la enzima a los distintos soportes no afectó a la enantioselectividad de la misma (tabla 3).

Ejemplo 9: Hidrólisis de aceite de pescado

Debido a la importancia fisiológica que presentan los ácidos grasos esenciales eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), se ensayó la producción de los mismos con diferentes derivados de esta enzima a partir de aceite de pescado.

La hidrólisis del aceite de pescado se llevó a cabo en un sistema de dos fases (orgánica:acuosa). El procedimiento seguido fue el siguiente: se preincubaron 5 ml de hexano, 5 ml de tampón fosfato 0,1 M, pH 6 y 0,5 ml de aceite de pescado durante 30 minutos y posteriormente, se adicionó 0,3 gramos de derivados de LipBL con agitación a 150 rpm. Para mantener constante el pH durante la reacción, se usó un pH-stat Mettler Toledo DL50. La concentración de ácidos grasos poliinsaturados libres se determinó a diferentes tiempos por HPLC.

Posteriormente se realizó el análisis de los ácidos grasos poliinsaturados libres (PUFAs) por HPLC. Una vez comenzada la reacción de hidrólisis, se retiraron alícuotas de 0,1 ml de fase orgánica a distintos tiempos. Estas alícuotas se disolvieron

en 0,8 ml de acetonitrilo. Los ácidos grasos insaturados producidos fueron analizados por RP-HPLC (Spectra Physic SP 100 acoplado con un detector UV Spectra Physic SP 8450) utilizando una columna Kromasil C8 (15 cm x 0,4 cm). Los productos se eluyeron a un flujo de 1 ml/min usando acetonitrilo-10 mM de amonio Tris Base a pH 8 en una proporción 70:30 (v/v) y la detección mediante luz UV se llevó a cabo a 215 nm. Los tiempos de retención para los ácidos grasos insaturados fueron: 9,4 minutos para el ácido eicosapentaenoico (EPA) y 13,5 minutos para el ácido docosahexaenoico (DHA).

A continuación se determinó la conversión de la hidrólisis, el porcentaje de hidrólisis se determinó relacionando la cantidad de EPA y DHA final (PUFAs) con el contenido inicial en el aceite, considerando que el contenido en PUFAs del aceite de pescado era el 30%. En un experimento, el porcentaje del área del punto más alto se asumió como porcentaje del contenido del correspondiente compuesto. La productividad de PUFAs (%) se calculó según la siguiente ecuación:

PUFAs (g/min) = PUFAS (%) x aceite de pescado (g/ml), en la cual el contenido en aceite de pescado era el peso del aceite de pescado presente en la mezcla.

De los resultados obtenidos se concluyó que LipBL hidroliza en gran medida el aceite de pescado mostrando una mayor preferencia por la producción del ácido eicosapentaenoico, la cual era 17 veces mayor que la producción del ácido docosahexaenoico en el caso del derivado bromocianógeno (Tabla 4).

Tabla 4. Hidrólisis de aceite de pescado con diferentes derivados de LipBL

Derivado	EPA/DH A	% total hidrólisis	EPA (%)	DHA (%)	% hidrólisis/ g catalizado	U p- NPB/g catalizado	Lipasa/esterasa
LipBL- Glioxil	3.1	0.6	0.9	0.3	2.2	13.1	0.2
LipBL- CNBr	16.8	4.6	8.5	0.5	9.3	12.6	0.7

LipBL-Glioxil-NH ₂	9.0	3.1	5.2	0.6	6.2	5.3	1.2
LipBL-Octil agarosa	3.15	1.5	1.5	0.5	4.3	23.7	0.2

El aceite de pescado ensayado, contenía un porcentaje de EPA de 18,6%, aumentando su contenido hasta un 27% por la acción de LipBL, lo que supondría un aumento de un 45,2% del total, y el contenido en DHA era de un 12,7%, aumentando hasta un 13,2% solamente y produciendo un aumento del 3,95%; Por lo tanto, esta enzima muestra bastante selectividad hacia el EPA, produciendo un incremento mayor en el caso del EPA que las lipasas descritas hasta el momento en la literatura.

Ejemplo 10: Hidrólisis de azúcares peracetilados

El sustrato hexaacetil lactal (compuesto 9) se disolvió en 2 ml de una mezcla de acetonitrilo 10% en tampón acetato amónico 25 mM para una concentración final de 1 mM de sustrato a 25°C y pH 6. La reacción se inició añadiendo 0,4 g de diferentes derivados inmovilizados de LipBL (figura 17). Los derivados de LipBL ensayados fueron: Glioxyl-LipBL, Sepharose Q-LipBL, Octyl Sepharose-LipBL y CNBr Sepharose-LipBL preparados según como se describe anteriormente.

Durante la reacción, el pH se mantuvo constante mediante el uso de pH-stat Mettler Toledo DL50. La actividad enzimática fue definida como micromol de sustrato hidrolizado por minuto y por mg de proteína inmovilizada. El grado de hidrólisis se analizó mediante HPLC de fase reversa (Spectra Physic SP 100 acoplado con un detector UV Spectra Physic SP 8450). Para la análisis del sustrato se utilizó una columna Kromasil C18 (25 x 0,4 cm) usando como fase móvil acetonitrilo-tampón fosfato amónico a pH 4 en una proporción 40:60 (v/v) y un flujo de 1ml/min. La detección mediante luz UV, se llevó a cabo a 210 nm.

Una vez comenzada la reacción de hidrólisis, se retiraron alícuotas de 0,05 ml de solución a distintos tiempos, se diluyeron con 0.2 ml de fase móvil y se analizaron en RP-HPLC según el método descrito antes. Los tiempos de retención detectados fueron: 16,5 minutos para el sustrato y 7 minutos para el producto de hidrólisis.

De los resultados obtenidos se concluyó que LipBL, cuando se encuentra inmovilizada en glioxil, hidrolizó de forma cuantitativa el hexaacetil lactal (producto 9, figura 17) con un rendimiento del 75% (bueno) (Tabla 5) hacia el producto monodesacetilado en posición 6 de la porción galactosídica (producto 10 (3,6,2',3',4'-penta-O-acetil lactal), figura 17).

Tabla 5. Hidrólisis regioselectiva del hexaacetil lactal con diferentes derivados de LipBL.

Derivado	Conversion. ^a (%)	Producto	Rendimiento ^b (%)	subproducto (%)
Glioxil-LipBL	>98	3,6,2',3',4',- penta-O- acetil lactal	75	20
SepharosaQ- LipBL	30	3,6,2',3',4',- penta-O- acetil lactal	5	23
Octil- Agarosa LipBL	<10	3,6,2',3',4',- penta-O- acetil lactal	3	5
BrCN-LipBL	40	3,6,2',3',4',- penta-O- acetil lactal	10	25

Condiciones de reacción: temperatura ambiente; 2ml de 10% acetonitrilo en buffer acetato amónico 25 mM pH6, concentración de sustrato 1 mM; 400 mg de cada derivado al iniciar la reacción.

^a % de sustrato convertido a las 24h

^b Analíticamente determinado por HPLC de los productos y confirmado por aislamiento y purificación por cromatografía flash

Este producto fue caracterizado por ESI-MS, H-NMR y 2D-COSY). Con los demás derivados se obtuvieron resultados inferiores. De esa forma, por primera vez, es posible conseguir enzimáticamente y de forma sencilla una monodesprotección regioselectiva de un precursor de un disacárido peracetilado en su posición primaria obteniendo un intermedio – el producto 10 (3,6,2',3',4'-penta-O-acetil lactal)- de gran

interés en la industria farmacéutica por la síntesis de glicoconjugados de alto valor añadido. Resultados similares no se encontraron en la literatura científica.

Ejemplo 11: Hidrólisis de Nitrocefín (sustrato beta-lactámico)

Debido a la alta similitud que presenta LipBL con la clase C de las beta-lactamasas, se procedió a realizar un ensayo para estudiar la posible actividad beta-lactamasa, para este fin se eligió el sustrato Nitrocefín que es una cefalosporina cromogénica que exhibe un rápido cambio de color del amarillo al rojo cuando el enlace amida del anillo beta lactámico es hidrolizado por una beta lactamasa. El ensayo se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

-Solución stock de Nitrocefín (500 mg/ml) aproximadamente 1 mM

Se disolvió 1 mg de Nitrocefín en 100 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) y se agitó (con vortex). Se añadieron 1,9 ml de buffer fosfato 100 mM pH 7 para producir un volumen total de 2 ml, la solución se protegió de la luz y se conservó a -20°C por un máximo de 2 semanas.

-Ensayo espectrofotométrico para determinar actividad beta-lactamasa: Para ello se diluyó 10 veces la solución stock preparada (500 mg/ml) en buffer 0,1 M de fosfato y 1 mM de EDTA pH 7: 1 ml de solución stock + 9 ml de buffer fosfato 0,1 M EDTA 1 mM pH 7 (solución definitiva).

El ensayo se llevó a cabo midiendo cambios en la absorbancia a 486 nm.

El coeficiente de extinción molar de la hidrólisis de nitrocefín a 486 nm fue de 20500 M⁻¹ cm⁻¹.

El ensayo se realizó mezclando 900 microlitros de la solución de nitrocefín definitiva con 100 microlitros de solución enzimática. En este ensayo se utilizó como control positivo la beta-lactamasa de *Bacillus cereus* y como control negativo la lipasa de *Chromobacterium viscosum*. De este estudio se dedujo que que LipBL presentó una actividad beta-lactamasa que representó un 20% de la actividad del control positivo (0,162 U/mg frente a los 0,810 U/mg de la beta-lactamasa de *Bacillus cereus*) (Figura 12).

REIVINDICACIONES

1. Uso de la lipasa LipBL para la hidrólisis de sustratos seleccionados de entre p-nitrofenoles, tributirina, Tween 80, aceites, sustratos quirales y proquirales, aceite de pescado, azúcares paracetilados o nitrocefín.
2. Uso de la lipasa LipBL según la reivindicación 1, donde la lipasa LipBL se encuentra unida a un soporte.
3. Uso de la lipasa LipBL según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el soporte es seleccionado de entre octil agarosa, dextrano sulfato, glioxil agarosa, aminoglioxil o bromocianógeno.
4. Uso de la LipBL según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el sustrato es un p-nitrofenol seleccionado de entre acetato, butirato, octanoato, decanoato, laurato, miristato o palmitato.
5. Uso de la lipasa LipBL según las reivindicaciones 1-3, donde los sustratos quirales y proquirales son seleccionados de entre dimetil 3-fenil glutarato, metil 3-fenil glutarato, madelato de metilo, ácido 2-O-butirol mandélico, 4-fenil-2-hidroxietilbutirato o hexaacetil lactal.
6. Uso de la lipasa LipBL según las reivindicaciones 1-3, para la hidrólisis de sustratos beta-lactámicos
7. Uso de la lipasa LipBL según la reivindicación 6, donde el sustrato beta-lactámico es nitrocefín.
8. Uso de la lipasa LipBL según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la lipasa es activa en un rango de temperatura comprendido entre 5-90°C.
9. Uso de la lipasa LipBL según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la lipasa LipBL es activa a pH comprendidos entre 4-9.
10. Uso de la lipasa LipBL según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la lipasa LipBL es activa en un rango salino comprendido entre 0-3 M de NaCl.

11. Uso de la lipasa LipBL para la monodesprotección regioselectiva de azúcares peracetilados.
12. Procedimiento para la monodesprotección regioselectiva de azúcares peracetilados para la obtención de azúcares monodesacetilados caracterizado porque la monodesprotección regioselectiva de dichos azúcares es llevada a cabo enzimáticamente mediante la lipasa LipBL.
13. Procedimiento según la reivindicación 12, donde el azúcar peracetilado es un disacárido peracetilado.
14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12-13, donde el azúcar monodesacetilado es el hexaacetil lactal.
15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, donde el azúcar monodesacetilado obtenido es el 3, 6, 2', 3', 4'-penta-O-acetil lactal.
16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12-15, donde la lipasa está unida a un soporte seleccionado de entre octil agarosa, dextrano sulfato, glioxil agarosa, aminoglioxil o bromocianógeno.
17. Kit para la monodesprotección regioselectiva de azúcares peracetilados según el procedimiento descrito en las reivindicaciones 12-16 que comprende la lipasa LipBL.

Fig. 1

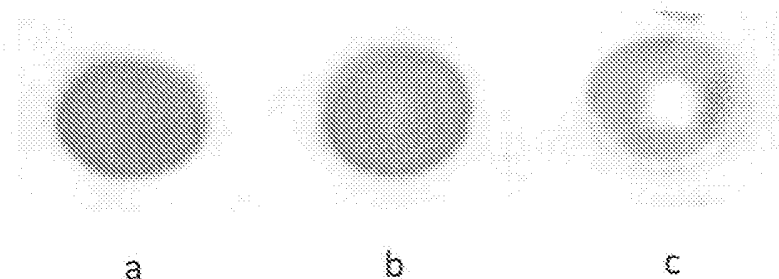


Fig. 2

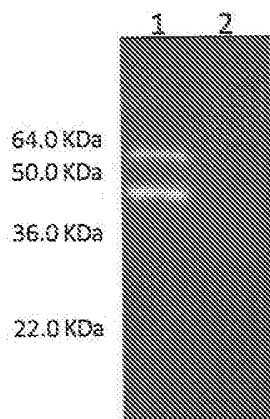


Fig. 3

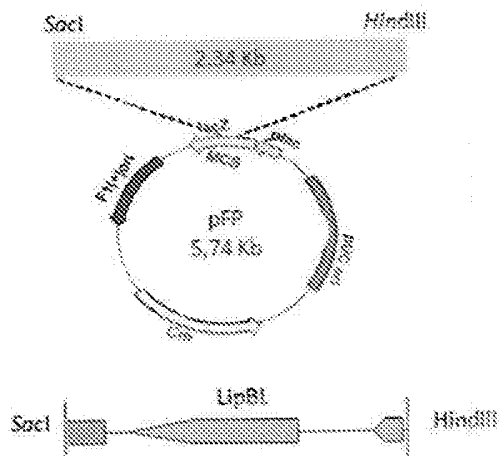


Fig. 5

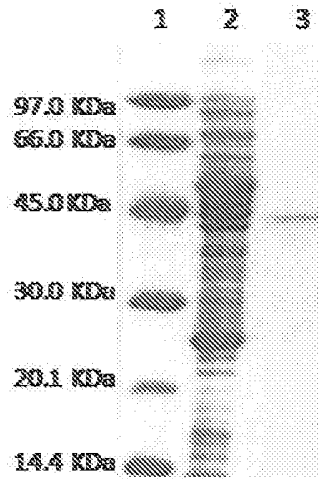


Fig. 6

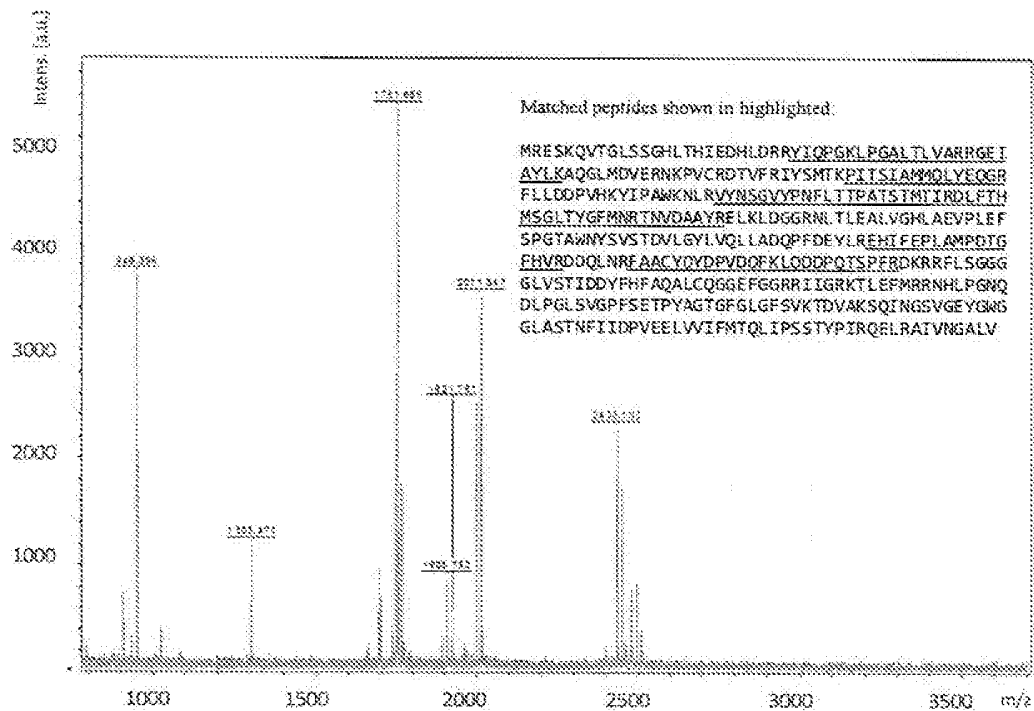


Fig. 7

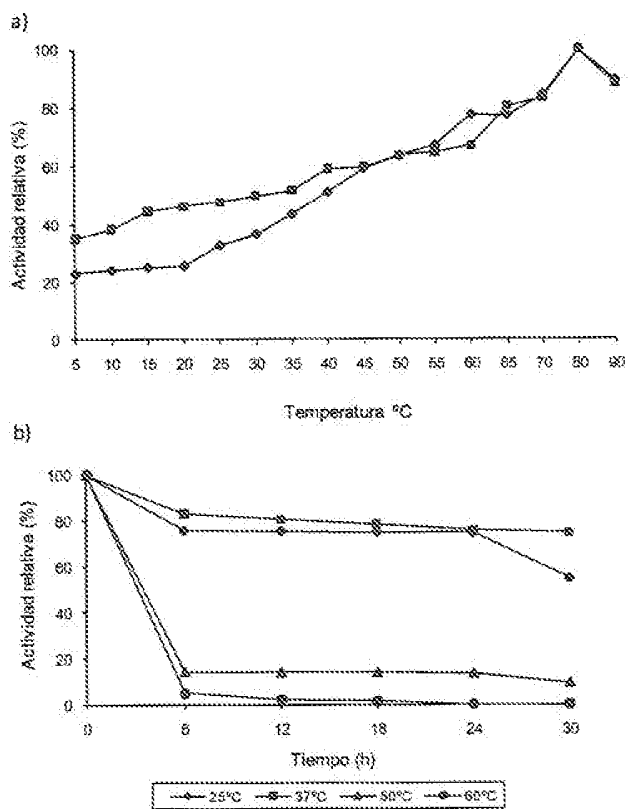


Fig. 8

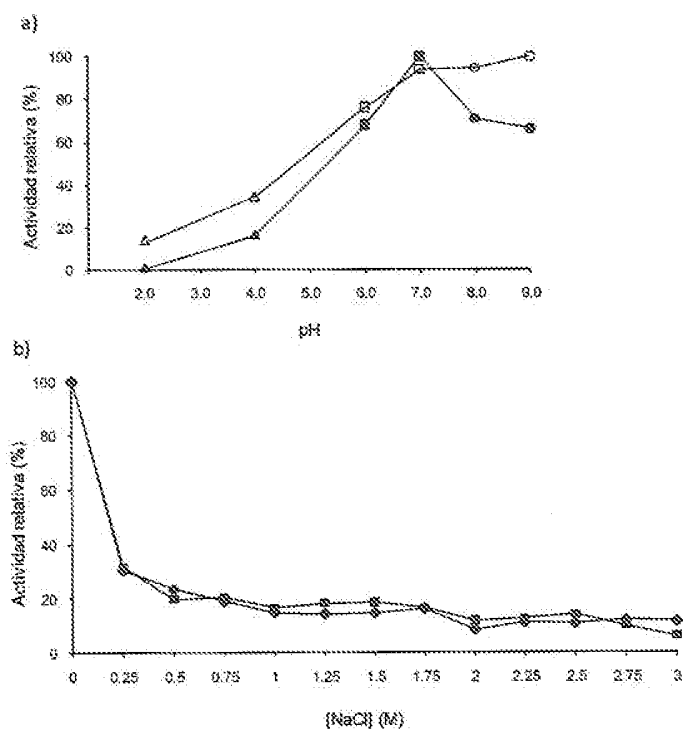


Fig. 9

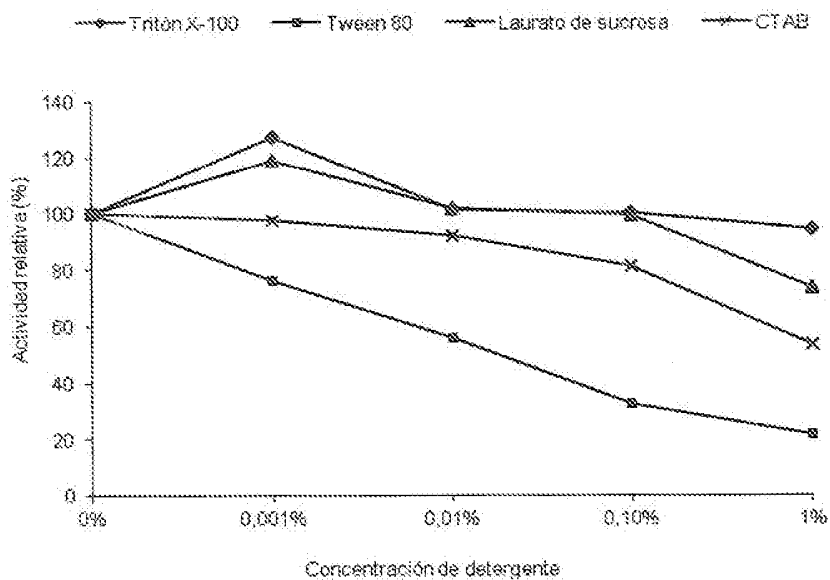


Fig. 10

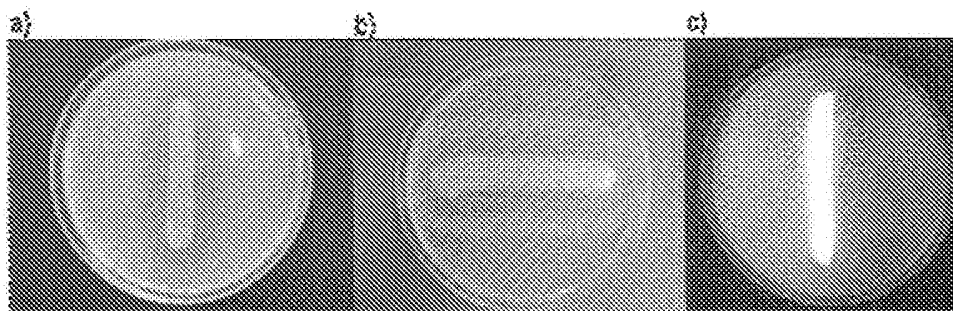


Fig. 11

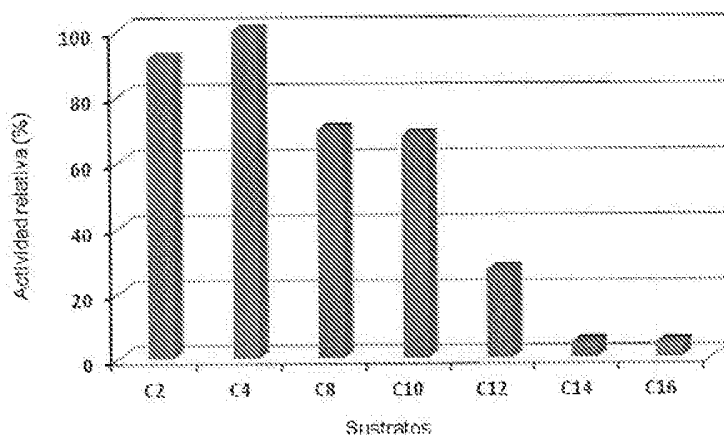


Fig. 12

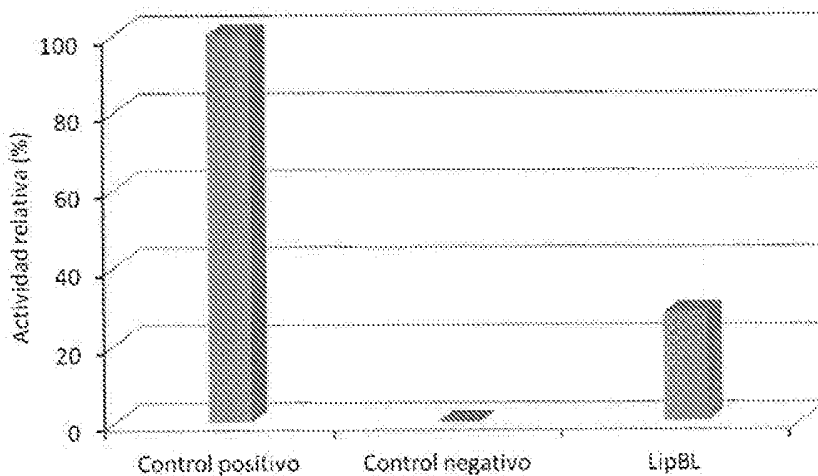


Fig. 13

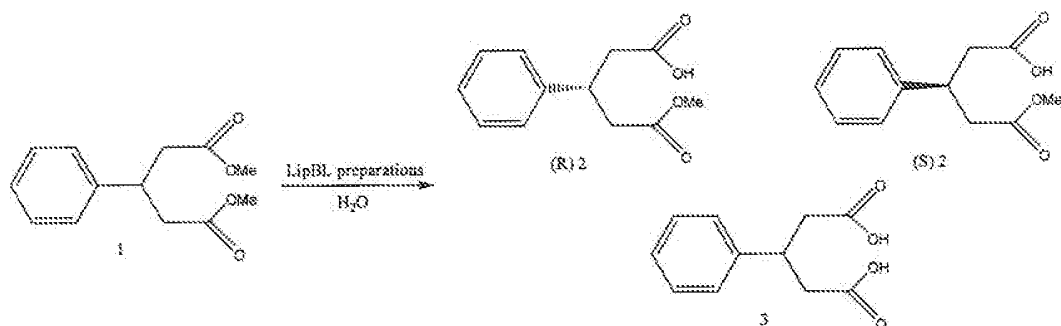


Fig. 14

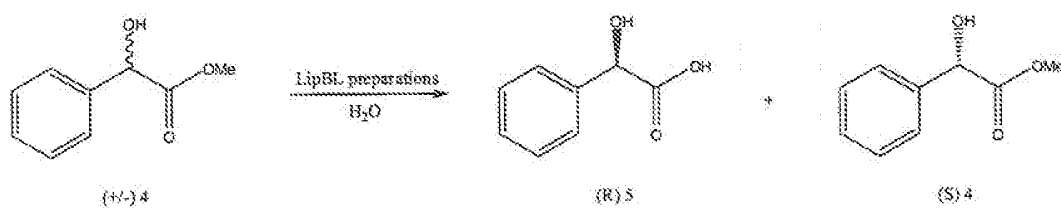


Fig. 15

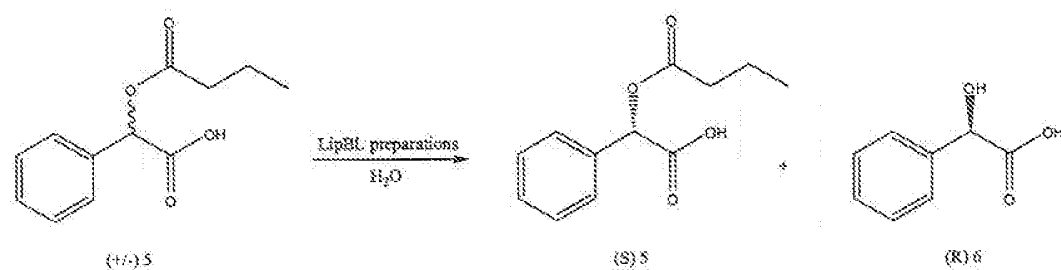


Fig. 16

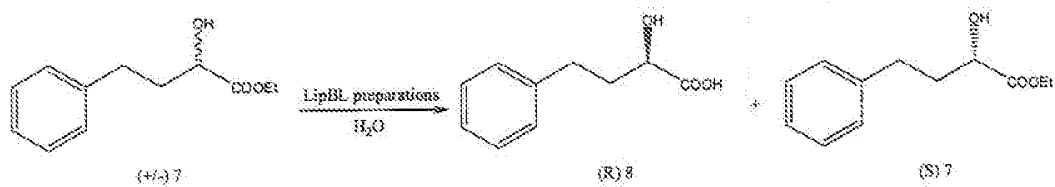


Fig. 17

