

Inmovilización enzimática mediante membranas poliméricas de inclusión basadas en líquidos iónicos

(Recibido: 10/04/2015; Aceptado: 21/05/2015)

J. M. Belchí-Parra, A. Escudero, F. Mateo-Ramírez, F. J. Hernández-Fernández, A. P. de los Ríos
Departamento de Ingeniería Química y Ambiental.
Universidad Politécnica de Cartagena. Campus Muralla del Mar.
C/Doctor Fleming s/n, Cartagena, Murcia, España. Teléfono: 968325548
Email: juanmiguel.belchi@gmail.com

Resumen. *Los líquidos iónicos presentan una gran utilidad como disolventes y también como medio de reacción, debido a que tienen una presión de vapor prácticamente nula y una alta estabilidad química, mecánica y térmica, lo que permite su reutilización. Se ha desarrollado un derivado enzimático inmovilizado en membranas poliméricas de inclusión basadas en líquidos iónicos para la síntesis de ésteres.*

Palabras clave. *Inmovilización, Líquido Iónico, Lipasa, PILMs.*

Abstract. *Ionic liquids are very useful solvents as well as reaction medium due to their negligible vapor pressure and high chemical, mechanical and thermal stability, which allow the reuse. An immobilized enzyme derivative in polymeric membranes based on ionic liquids has been developed for the synthesis of esters.*

Keywords. *Immobilization, Ionic Liquids, Lipase, PILMs.*

1. Introducción

Dentro del ámbito de la Química verde, se propugna la sustitución de disolventes orgánicos por líquidos iónicos y su uso como medio líquido en membranas líquidas soportadas. Para ello se han desarrollado nuevos derivados inmovilizados con enzimas basados en el empleo de líquidos iónicos ocluidos en membranas de PVC. La pérdida de actividad enzimática debida a la inmovilización ha sido contrastada con la de la enzima libre.

Con el uso de líquidos iónicos en la producción de las membranas, se han obtenido nuevos reactores enzimáticos de manera que la actividad, selectividad y estabilidad del enzima ha sido potenciada. Estos reactores permiten una sencilla separación del catalizador biológico del medio de reacción, ofreciendo la posibilidad de ser reutilizados.

Su aplicación se puede enfocar a procesos más respetuosos con el medio ambiente en los que se consumen menores cantidades de disolventes orgánicos como hexano. Sin embargo, la actividad catalítica de la enzima disminuye notablemente con el empleo de líquidos iónicos miscibles con agua ya que provocan su desnaturalización. Frente a esto la inmovilización enzimática es un método muy empleado para estabilizar biocatalizadores. Paralelamente permite reducir costes asociados a los procesos de reutilización del catalizador facilitando su separación de una forma más eficiente.

Se han obtenido buenos resultados inmovilizando la enzima lipasa B de *Candida antarctica* mediante absorción y entrecruzamiento covalente sobre soporte de polipropileno de forma que se mantenía la actividad catalítica en los líquidos iónicos probados que, a priori, desactivaban la enzima libre.

La industria de química fina demanda membranas que permitan la separación de sustratos por grupo funcional.

1.1. Enzimas

Las enzimas son proteínas que tienen la función de catalizar las reacciones químicas en los sistemas vivos, acelerando la velocidad de las mismas hasta cientos de miles de veces, y haciéndolas más efectivas, ya que se requiere muy poca cantidad de una enzima para producir altos grados de transformación. Para ello, la energía de activación enzimática debe ser significativamente menor que la de la reacción no enzimática.

Las enzimas poseen una estructura tridimensional que determina las sustancias específicas sobre las que pueden actuar, lo que generalmente hace de ellas unos catalizadores muy selectivos, permitiendo incluso la distinción entre los componentes de una mezcla racémica.

Al estar destinadas a comportarse como catalizadores biológicos, han sido concebidas para actuar en medios acuosos y en condiciones muy suaves de presión, temperatura y pH, lo que las diferencia enormemente de los catalizadores inorgánicos. No obstante, se han usado con éxito en condiciones "no convencionales", como los medios orgánicos, líquidos iónicos y sustratos artificiales.

1.2. Medios no convencionales de reacción en biocatálisis

Las enzimas están diseñadas para realizar una función catalítica sobre todas las reacciones que tienen lugar en el interior de las células de los seres vivos en las que se encuentran presentes. El disolvente predominante en el interior de las células

es el agua, aunque las enzimas no son capaces de funcionar correctamente en medios formados únicamente por agua pura. En su ambiente nativo lo hacen en entornos compuestos por lípidos, proteínas y otras especies iónicas además de agua. De acuerdo con lo anterior, el medio acuoso podría definirse como el "medio convencional" en el que las enzimas desarrollan su acción. Cuando se emplea el término "medios no convencionales" se hace referencia a medios no acuosos.

La mayoría de los compuestos orgánicos son insolubles en agua, y en ella pueden tener lugar reacciones colaterales no deseadas (hidrólisis, racemizaciones, etc.). El equilibrio termodinámico de muchos procesos es desfavorable en agua, y la recuperación de los productos no es trivial (el agua es un disolvente difícil de eliminar por su alto punto de ebullición y calor de vaporización). Además, el agua puede dar lugar a numerosas reacciones de desactivación enzimática irreversible, por lo que contar con medios no acuosos o de actividad de agua reducida previene contra esta desactivación y contribuye a aumentar la estabilidad de la enzima.

Independientemente del medio utilizado, la expresión de la actividad catalítica de la enzima necesita del mantenimiento de su estructura nativa tridimensional, para lo cual se requiere la presencia de un contenido mínimo o crítico de agua. En muchos de estos casos no hay más que una fase acuosa microscópica disuelta, correspondiente a aquella que está unida al biocatalizador y le permite al mismo adoptar dicha conformación activa, sin la cual no podría funcionar.

Muchas enzimas siguen siendo activas al suspenderlas en disolventes orgánicos no polares que contienen muy poca agua. Las disoluciones altamente no polares no son disolventes para las proteínas y no interactúan con la enzima o con el agua de su superficie. Además, los disolventes no polares son, con frecuencia, pobres disolventes para sustratos de interés.

Por otro lado los disolventes orgánicos polares proporcionan un mejor medio de reacción para muchas aplicaciones de tipo industrial y sintético. No obstante, los disolventes orgánicos polares de interés práctico, como la acetona o la dimetil-formamida, interactúan fuertemente con la enzima y las moléculas de agua asociadas a la misma, reduciendo o destruyendo totalmente su actividad catalítica, por lo que se buscan otras alternativas. No todas las enzimas responden de la misma manera al ser suspendidas en medios no acuosos y este hecho parece estar fuertemente relacionado con la capacidad del medio para separar las moléculas de agua de la superficie proteica.

Desafortunadamente no existe una relación directa entre la pérdida de actividad enzimática en disolventes no acuosos y la polaridad del disolvente. En general, al aumentar la polaridad del disolvente orgánico disminuye la actividad enzimática.

El principal factor en el efecto que tienen los disolventes orgánicos sobre los biocatalizadores no es su interacción directa con las moléculas de enzima, sino con el agua unida a las mismas.

Considerando un medio totalmente deshidratado y otros a los que se les ha añadido pequeñas cantidades de agua, se puede observar que la actividad aumenta al hacerlo la cantidad de agua presente hasta alcanzar una determinada cantidad, y a partir de ahí comienza a decrecer conforme sigue aumentando la cantidad de agua. Esto se debe a que si hay una elevada cantidad de agua presente, la enzima puede hidratarse totalmente y rodearse por varias capas de agua que dificulten el acceso de los sustratos hidrofóbicos al centro activo.

1.3. Membranas poliméricas de inclusión basadas en líquidos iónicos (PILMs)

Los líquidos iónicos se pueden definir como sales cuya temperatura de fusión está por debajo de 100°C. Realmente la mayoría de los líquidos iónicos que aparecen en la literatura son líquidos a temperatura ambiente. La diferencia de los líquidos iónicos con las sales fundidas se encuentra en que los líquidos iónicos se presentan líquidos a temperaturas más bajas que las sales fundidas. La principal característica de los líquidos iónicos, que comparten con las sales fundidas, es el amplio intervalo de temperatura en el que se presentan líquidos. Los líquidos iónicos están formados por un anión y por un catión orgánico muy asimétrico, lo cual le proporciona una estructura poco compacta que requiere tan solo un pequeño aporte de energía para separarlas, mientras que las sales fundidas son muy compactas.

Las membranas líquidas soportadas (SLM) consisten en soportes porosos en los cuales se ocluye un líquido [1]. El uso de los líquidos iónicos a temperatura ambiente como fase líquida en SLMs es particularmente interesante debido a que hace posible la obtención de membranas más estables gracias a su carácter no volátil, a la posibilidad de minimizar la solubilidad en las fases circundantes mediante la adecuada selección del catión y del anión constituyentes del líquido iónico y a la alta fuerza capilar asociada a su alta viscosidad, que permite reducir el desplazamiento del líquido iónico de los poros bajo presión. Todo ello hace posible obtener membranas líquidas soportadas muy estables, sin pérdida observable de líquido iónico a la atmósfera o a las fases en contacto. Otras propiedades interesantes de los líquidos iónicos para ser utilizados en membranas líquidas soportadas son su elevada estabilidad térmica, su alta conductividad iónica y su nula inflamabilidad. Además, son capaces de disolver una amplia variedad de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos a la vez que son inmiscibles con numerosos compuestos orgánicos e incluso con agua.

Por otra parte, las membranas poliméricas de inclusión basadas en líquidos iónicos (PILM) se

obtienen mediante la mezcla de un polímero orgánico y un líquido iónico en presencia de un disolvente orgánico. El resultado es una membrana densa con líquido iónico ocluido en una matriz plástica.

2. Materiales y métodos

2.1. Ensayo de reacción

Se ha empleado como reacción de ensayo la transesterificación de butirato de vinilo (150mM) con 1-butanol (150mM) obteniéndose butirato de butilo [2]. Como líquido iónico ocluido en la membrana de PVC será usado hexafluorofosfato de 1-metil-3-octilimidazolio [omin+][PF6-]. Todos los reactivos utilizados son de la máxima pureza disponible.

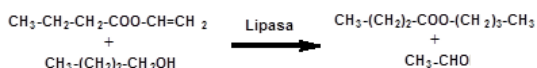


Fig. 1. Reacción de síntesis de butirato de butilo.

Se han preparado dos membranas, una con presencia de buffer fosfato y otra con el preparado enzimático comercial y se ha llevado a cabo una reacción para determinar la actividad catalítica de estos derivados enzimáticos inmovilizados frente a la enzima libre.

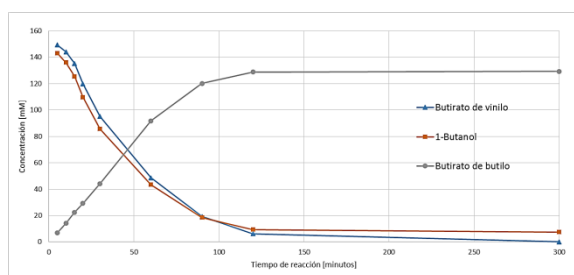


Fig. 2. Ejemplo de un perfil de reacción a 30°C.

3. Resultados y discusión

La eficacia de la acción enzimática se ha cuantificado mediante la actividad específica que se define como unidades de actividad sintética por miligramo de proteína. Se define una unidad de actividad sintética como la cantidad de enzima que es capaz de realizar la síntesis de 1 μmol de éster alquílico (butirato de butilo) por minuto.

$$A = \frac{m_{\text{ButBut}} \cdot 10^6 \cdot V_{\text{reacción}}}{C_{\text{CalB}} \cdot V_{\text{CalB}}}$$

m_{ButBut} = Pendiente inicial de la curva de síntesis de Butirato de Butilo expresada en mol · (L · min)⁻¹.
 C_{CalB} = Concentración de proteína del preparado enzimático.
 V_{CalB} = Volumen de preparado enzimático utilizado.
 $V_{\text{reacción}}$ = Volumen total de reacción (1 mL)

Los valores de actividad específica obtenidos vienen reflejados en la Tabla 1. De la comparación de los valores de actividad específica de los reactores con PILMs y el reactor con enzima libre se desprende, como resultado más importante, que la actividad de la enzima inmovilizada es mayor que la de la lipasa libre. Estos resultados son especialmente trascendentes ya que lo normal es que la

inmovilización de la enzima disminuya su actividad específica. El nuevo método de inmovilización que emplea líquidos iónicos ha logrado superar este hándicap que presentan los derivados enzimáticos convencionales. Además, la actividad en el reactor que contiene el derivado inmovilizado diluido con la disolución reguladora de pH fue mayor que cuando se empleó cuatro veces más de enzima sin diluir. Este hecho puede ser explicado por el efecto estabilizante del tampón y por la agregación enzimática que se produce cuando se emplea mayor cantidad de enzima, principalmente en el caso de la enzima libre [3]. El incremento de la agregación enzimática reduce la cantidad de enzima en contacto con los sustratos y por tanto, la actividad catalítica.

Tabla 3 Actividad específica de los diferentes biocatalizadores.

Reactor	Actividad específica
PILM buffer	7.9
PILM	6.4
Enzima libre	3.5

4. Conclusiones

La actividad específica de este nuevo derivado inmovilizado es mayor que la de la lipasa libre, consiguiendo un nuevo biocatalizador que mantiene su actividad e incluso la incrementa con una cantidad de lipasa menor.

Por lo tanto se ha demostrado que el empleo de líquidos iónicos permite obtener unos derivados enzimáticos inmovilizados, con propiedades catalíticas similares o incluso mejores que la lipasa libre, con la ventaja añadida que se puede separar del medio y reutilizar.

Referencias

- [1] L.J. Lozano, C. Godínez, A.P. de los Ríos, F.J. Hernández-Fernández, S. Sánchez-Segado, F.J. Alguacil, Recent advances in supported ionic liquid membrane technology, *J. Membr. Sci* 376 (2008) 1– 14.
- [2] Antonia P. de los Ríos, Francisco J. Hernández-Fernández, Francisca A. Martínez, Manuel Rubio, Gloria Villora, The effect of ionic liquid media on activity, selectivity and stability of CaLB in transesterification reactions. *Biocatalysis and Biotransformation*, August (2007), Pages 151–156.
- [3] Antonia P. de los Ríos, Francisco J. Hernández-Fernández, F. Tomás-Alonso, Demetrio Gómez, Gloria Villora, Synthesis of esters in ionic liquids: The effect of vinyl esters and alcohols, *Proc. Bio Volume* 43, Issue 8, August (2008), Pages 892–895.