Biotransformación de tributirina en 1,2-dibutirina mediante la metanólisis catalizada por lipasas *Candida Antarctica B* y *Rhizomucor Miehei*

Juan Sebastian Mora Navarrete

Trabajo de Grado para Optar al Título de Químico

Director

John Jairo Castillo León, Químico, PhD

Codirectora

Claudia Cristina Ortiz López, Microbióloga, PhD

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias Básicas

Escuela de Química

Bucaramanga

1

2022

Dedicatoria

A Dios, fue guía y director desde el primer instante.

A mi madre Cristina, y mi padre Carlos, por apoyarme en los momentos más complicados y en los que pensaba darme por vencido.

Times of change are the most important moments in life and being capable to adapt is the most intelligent thing that evolution has given to us.

Agradecimientos

A mis padres Cristina y Carlos, por el apoyo incondicional a lo largo del proceso de formación desde temprana edad.

A la Dra. Claudia Ortiz y al Dr. John Castillo, por dar la confianza, la oportunidad y el apoyo de generar esta investigación... mi proyecto de grado.

A Mónica Ruiz, por estar presente desde el principio y hasta el fin, independientemente de las condiciones o los momentos. Por las revisiones y la experiencia que fue transmitida en forma de conocimiento.

Al Dr. William Hidalgo, por mostrar y enseñar con pasión la rama de la bioquímica, razón por la que decanté mi elección para realizar mi proyecto de grado. Además, por toda la ayuda brindada a lo largo del mismo.

Al grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología de la Universidad Industrial de Santander y a todos sus integrantes, que permitieron la discusión, análisis y solución de los diferentes problemas a los que me vi enfrentado durante el proyecto.

Al Laboratorio de Análisis Instrumental y al Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Salud por la prestación de servicios que permitieron el análisis de resultados del proyecto.

A Colciencias y a la Vicerrectoría de investigación y extensión, por la financiación del macroproyecto del que hizo parte mi trabajo de grado.

A mis amigos y compañeros de carrera Jesús, B., Jennifer, C., Laura, P., Natalia, R., Silvia, C. que estuvieron presentes en los momentos difíciles y en las risas.

Tabla de Contenido

Introducción14
1. Objetivos
1.1. Objetivo general
1.2. Objetivos específicos
2. Marco teórico
2.1. Lipasas
2.1.1. Estructura
2.1.2. Mecanismo de activación interfacial19
2.1.3 Inmovilización enzimática
2.1.3.1 Inmovilización sobre soportes hidrófobos
2.1.3.2. Inmovilización sobre soportes covalentes
2.1.4. Lipasa Candida antarctica B (CALB)
2.1.5. Lipasa Rhizomucor miehei (RML)
2.2. Glicerol en la producción de biodiesel
2.3. Diglicéridos: relevancia y obtención
2. Materiales y métodos
3.1. Materiales y reactivos
3.2. Métodos experimentales
3.2.1. Inmovilización de lipasas en soporte de Octil sefarosa por vía de activación interfacial
3.2.2. Inmovilización de lipasas en soporte de Octil glioxil sefarosa por unión covalente 25

3.2.3. Hidrolisis/Metanólisis de tributirina
3.3. Métodos analíticos
3.3.1. Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford26
3.3.2. Medición de la actividad enzimática con la hidrolisis de p-nitrofenilbutirato
3.3.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida – SDS PAGE en una dimensión
3.3.3.1. Preparación de los geles
3.3.3.2. Preparación de las muestras
3.3.3.3. Tinción con el método de azul de Coomassie
3.3.4. Análisis de muestras por cromatografía de alta eficiencia HPLC en fase reversa27
3.3.5. Cálculo de la actividad hidrolítica para tributirina
4. Resultados y discusión
4.1. Inmovilizaciones de las lipasas <i>Candida Antarctica B</i> y <i>Rhizomucor Miehei</i> en soportes hidrófobos
4.1.1. Inmovilización de las lipasas Candida antarctica B y Rhizomucor miehei por activación interfacial empleando Octil sefarosa [OC] como soporte
4.2. Análisis de los derivados enzimáticos preparados en laboratorio por electroforesis SDS- PAGE
4.3. Reacción de metanólisis empleando los derivados inmovilizados de OC-CALB, OC-RML, OC-GLX-CALB y OC-GLX-RML
4.3.1. Reacción de metanólisis (50 % de metanol)
4.3.2. Reacción de metanólisis (75 % de metanol)
4.3.3. Reacción de metanólisis (100 % de metanol)
4.4. Reacción de metanólisis empleando los derivados comerciales Novozyme 435 y LipozymeRM IM
4.4.1. Lipozyme RM IM

4.4.2. Novozyme 435	
4.5. Comparación de la regioselectividad de reacción y la especificidad de su los derivados preparados en laboratorio OC-CALB, OC-RML, OC-GLX-C RML y los derivados comerciales Novozyme 435 y Lipozyme RM IM	Strato por parte de ALB y OC-GLX-
Conclusiones	
Recomendaciones	
Referencias bibliográficas	
Apéndices	

Lista de Tablas

Tabla 1. Comparativa de los derivados enzimáticos en cuanto a su regioselectividad de reacción
y especificidad de sustrato en relación con el porcentaje de metanol en el medio de reacción.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de activación interfacial de las lipasas (Tomado de Ruiz, 2012)19
Figura 2: Equilibrio y adaptación de la lipasa inmovilizada por mecanismo de activación
interfacial sobre soporte hidrofóbico (Arroyo, 1998)
Figura 3: Adaptación enzima inmovilizada por mecanismo de unión covalente: arriba
unipuntual, abajo multipuntual (Arroyo, 1998)
Figura 4: Reacción de transesterificación por metanólisis de tributirina como sustrato23
Figura 5: Curso experimental y biocatalizadores inmovilizados empleados en las reacciones
enzimáticas
Figura 6. a) Cinética de inmovilización sobre soportes de octil sefarosa de la lipasa Candida
Antarctica B. b) Porcentaje de proteína (CALB) inmovilizada en función del tiempo
Figura 7. a) Cinética de inmovilización de Rhizomucor Miehei en el soporte octil sefarosa. b)
Porcentaje de proteína (RML) inmovilizada en octil sefarosa en función del tiempo30
Figura 8. a) Cinética de inmovilización de Candida Antarctica B en el soporte octil glioxil
sefarosa. b) Porcentaje de proteína (CALB) inmovilizada en octil glioxil sefarosa en función
del tiempo
Figura 9. a) Cinética de inmovilización de Rhizomucor Miehei en el soporte octil sefarosa. b)
Porcentaje de proteína (RML) inmovilizada en octil sefarosa en función del tiempo31
Figura 10: Análisis mediante SDS-PAGE de los extractos enzimáticos puros y los derivados
enzimáticos preparados en laboratorio de las lipasas Candida Antarctica B y Rhizomucor
Miehei
Figura 11. Cinética de hidrolisis/metanólisis (al 50 % de metanol) de la tributirina utilizando
los cuatro derivados inmovilizados en el laboratorio a) Producción de 1,2-dibutirina. b)
Producción de 1,3-dibutirina

Figura 12. Cinética de hidrolisis/metanólisis (al 75 % de metanol) de la tributirina utilizando
los cuatro derivados inmovilizados en el laboratorio a) Producción de 1,2-dibutirina. b)
Producción de 1,3-dibutirina
Figura 13. Cinética de hidrolisis/metanólisis (al 100 % de metanol) de la tributirina utilizando
los cuatro derivados inmovilizados en el laboratorio a) Producción de 1,2-dibutirina. b)
Producción de 1,3-dibutirina
Figura 14. a) Cinética de reacción en la producción de 1,2-dibutirina. b) Cinética de reacción
en la producción de 1,3-dibutirina, empleando el derivado comercial Lipozyme RM IM, en
medios de reacción del 50 % y 75 % de metanol
Figura 15. a) Cinética de reacción en la producción de 1,2-dibutirina. b) Cinética de reacción
en la producción de 1,3-dibutirina, empleando el derivado comercial Novozyme 435, en medios
de reacción del 75 % y 100 % de metanol

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice A. Curva de calibración – método de Bradford	. 49
Apéndice B. Actividad hidrolítica de los derivados versus p-NPB.	. 49
Apéndice C Gradiente para análisis por RP-HPLC	. 50
Apéndice D Actividad volumétrica de los derivados enzimáticos	. 50
Apéndice E Actividad de los derivados enzimáticos	. 51

Lista de abreviaturas

Significado
Lipasa B de Candida Antarctica
Diacilglicérido
Lipasa B de Candida Antarctica inmovilizada en octil sefarosa
Lipasa B de Candida Antarctica inmovilizada en octil glioxil sefarosa
Lipasa de Rhizomucor Miehei inmovilizada en octil glioxil sefarosa
Lipasa de Rhizomucor Miehei inmovilizada en octil sefarosa
para-nitrofenilbutirato
Lipasa de Rhizomucor Miehei
Cromatografía liquidad de alta eficiencia en fase reversa
Triacilglicérido

Resumen

Título: Biotransformación de tributirina en 1,2-dibutirina mediante la metanólisis catalizada por lipasas *Candida Antarctica B* y *Rhizomucor Miehei* *

Autor: Juan Sebastian Mora Navarrete **

Palabras clave: 1,2-dibutirina, tributirina, lipasas, lipasas inmovilizadas, metanólisis de tributirina, mecanismo de activación interfacial, unión covalente.

El glicerol crudo, proveniente de la producción de biodiesel presenta baja aplicabilidad en la industrial. Sin embargo, varios triacilglicéridos pueden ser sintetizados haciendo uso de este subproducto. De la reacción entre el ácido butírico y el glicerol, se obtiene la tributirina. La tributirina puede ser biotransformada empleando lipasas para la obtención de moléculas como la 1,2 dibutirina, la cual genera mayor interés económico y químico. En esta investigación se llevó a cabo la comparación de la actividad, regioselectividad y estabilidad de reacción de la biotransformación de la tributirina a 1,2-dibutirina por medio de la reacción de metanólisis mediada por las lipasas comerciales de Candida Antarctica B, Novozyme 435 y Rhizomucor Miehei, Lipozyme RM IM. Además, se probaron derivados enzimáticos inmovilizados de las lipasas en laboratorio. La inmovilización se realizó mediante mecanismos de activación interfacial y unión covalente, en soportes con características hidrofóbicas como lo son la octil sefarosa y la octil glioxil sefarosa. Por otra parte, las reacciones de metanólisis se realizaron haciendo uso de los diferentes biocatalizadores bajo las mismas condiciones de reacción (25°C, pH 5.5, baja fuerza iónica, 100mM tributirina, 4 horas de reacción y 250 rpm agitación orbital). Además, se probaron diferentes concentraciones de metanol en el medio de reacción (50, 75 y 100 %). Todos los derivados presentaron actividad metanolítica y produjeron 1,2-dibutirina en las reacciones con las tres relaciones de metanol. De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluyó que los derivados de OC-RML, OC-CALB y OC-GLX-CALB presentaron la mejor actividad, regioselectividad y especificidad de sustrato, favoreciendo la producción de la 1,2dibutirina con porcentajes máximos de conversión a 1,2-dibutirina de 51,8 %, 48,7 % y 45,9 % respectivamente. Estos resultados sugieren la posibilidad de utilizar derivados enzimáticos regio-específicos en reacciones de metanólisis con miras a uso industrial para la obtención de compuestos con valor agregado como los 1,2-diacilglicéridos provenientes del glicerol crudo.

^{*} Trabajo de grado

^{**} Facultad de Ciencias Básicas. Escuela de Química. Director: John Jairo Castillo León, Químico, PhD., Codirectora: Claudia Cristina Ortiz López, Microbióloga, PhD.

Abstract

Title: Biotransformation of tributiryn to 1,2-dibutiryn through metanolysis catalyzed by lipases *Candida Antarctica B* and *Rhizomucor Miehei* *

Author: Juan Sebastian Mora Navarrete **

Key words: 1,2-dubutiryn, tributiryn, lipases, immobilized lipases, tributiryn methanolysis, interfacial activation mecanism, covalent bonding.

Crude glycerol from biodiesel production has low applicability in industry. However, various triacylglycerides can be synthesized making use of this by-product. From the reaction between butyric acid and glycerol, tributyrin is obtained. Tributyrin can be biotransformed using lipases to obtain molecules such as 1,2-dibutyrin, which generates greater economic and chemical interest. In this investigation, the comparison of the activity, regioselectivity and reaction stability of the biotransformation of tributyrin to 1,2-dibutyrine was carried out by means of the methanolysis reaction mediated by the commercial lipases of Candida Antarctica B, Novozyme 435 and Rhizomucor Miehei, Lipozyme RM IM. In addition, immobilized enzyme derivatives of the lipases were tested in the laboratory. The immobilization was carried out through mechanisms of interfacial activation and covalent bonding, in supports with hydrophobic characteristics such as octyl sepharose and octyl glyoxyl sepharose. On the other hand, the methanolysis reactions were carried out using the different biocatalysts under the same reaction conditions (25°C, pH 5.5, low ionic strength, 100mM tributyrin, 4 hours of reaction and 250 rpm orbital stir). In addition, different concentrations of methanol in the reaction medium (50, 75 and 100%) were tested. All the derivatives showed methanolytic activity and produced 1,2dibutyrin in the reactions with the three methanol ratios. According to the results obtained, it was concluded that the derivatives of OC-RML, OC-CALB and OC-GLX-CALB presented the best activity, regioselectivity and substrate specificity, favoring the production of 1,2-dibutyrin with maximum percentages. conversion to 1,2-dibutyrin of 51.8%, 48.7% and 45.9% respectively. These results suggest the possibility of using regio-specific enzyme derivatives in methanolysis reactions with a view to industrial use to obtain value-added compounds such as 1,2-diacylglycerides from crude glycerol.

^{*} Bachelor thesis

^{**} Basic sciences Faculty. Chemistry School. Director: John Jairo Castillo León, Chemist, PhD., Co-director: Claudia Cristina Ortiz López, Microbiologist, PhD.

Introducción

Durante los últimos años, los científicos han centrado cierta parte de sus estudios en la búsqueda de formas de generación de energías alternativas que sean rentables, amigables con el medio ambiente y fáciles de producir (Caetano et al., 2017). Una de las soluciones busca reemplazar el uso de combustibles fósiles, disminuyendo así la generación de gases de efecto invernadero con la producción y utilización de biocombustibles. Los biocombustibles son un tipo de combustible que provienen de la reutilización de residuos orgánicos y son un recurso de energía verde. El biodiesel se produce a partir de grasas de origen vegetal o animal y alcoholes de cadena corta (biomasa), dando como subproducto el glicerol. Este residuo representa aproximadamente el 10% en peso del biocombustible producido (Rodrigues et al., 2017). El glicerol crudo no tiene una alta funcionalidad y debe ser refinado mediante métodos químicos y físicos de alto costo (ultrafiltración utilizando membranas de polímeros orgánicos tratadas con resinas de intercambio iónico, electrodiálisis, tratamiento en medio básico con resinas de intercambio iónico y catiónico) para ser empleado a nivel industrial; lo que genera la acumulación de este subproducto, perdiendo su valor a medida que aumenta la demanda de biodiesel (Buenemann et al., 1991; Leoneti et al., 2012; Lourinho y Brito, 2015).

En Colombia, desde principios de la primera década del 2000 se ha estipulado por ley (ley 693 de 2001, del etanol carburante; ley 939 de 2004, del biodiésel) la utilización de biodiesel como aditivo (9-10%) para el diésel fósil; esto conlleva una reducción en el costo del combustible y una disminución significativa del impacto ambiental que estos generan. La demanda de biodiésel en el país el último año (2021) fue de 52.843 toneladas/mes (Federación Nacional de Biocombustibles [Fedecombustibles] 2021). Por lo que es importante para la industria colombiana de biocombustibles encontrar alternativas que permitan solucionar la problemática de la acumulación de glicerol.

Una de estas alternativas para solución del problema en cuestión es la producción de compuestos con valor agregado a partir del glicerol; Un ejemplo es mediante su esterificación total con ácidos grasos de cadena alifática corta, al utilizar ácido butírico y glicerol para generar tributirina (Triglicérido; glicerol sustituido con tres grupos butanoato), compuesto utilizado en el sector farmacéutico como tratamiento para el cáncer de colon y enfermedades intestinales, también empleado en el sector alimenticio agrícola (Gaschott et al., 2001; Manrique y González., 2017). Sin embargo, el diglicérido de la tributirina, la 1,2- dibutirina, en principio genera mayor interés y valor agregado debido a que es un regioisómero que posee un centro

quiral en el carbono dos (2) del glicerol; lo cual hace a la tributirina un compuesto atractivo químicamente para obtener el diglicérido regioisoméricamente puro (1,2-dibutirina). Una manera factible de obtener este regioisómero es mediante la biotransformación de la tributirina empleando lipasas (Hirata., et al., 2016).

Las lipasas son enzimas que poseen características altamente aprovechables, debido a que poseen una alta estereoespecificidad, también son regio y enantio selectivas, además, se pueden utilizar en reacciones de: transesterificación, esterificación, hidrólisis, alcohólisis, interesterificación, etc. (Hernandez et al., 2011; Rodrigues y Ayub, 2011)

En los últimos veinte años un gran número de investigaciones científicas han demostrado que las lipasas poseen dos estados conformacionales. En uno de ellos el centro activo de la enzima se encuentra protegido por una cadena polipeptídica "tapadera o lid" que impide la entrada del sustrato, inhibiendo así la actividad enzimática; esta conformación se conoce como "conformación cerrada" y es inactiva. La otra conformación se establece cuando la lid despeja al centro catalítico, permitiendo la interacción de la enzima con el sustrato, activándose e iniciando la reacción química; a esta conformación con actividad enzimática se le denomina "conformación abierta".

En medio acuoso las lipasas se encuentran en un equilibrio entre sus dos estados conformacionales, favoreciendo la conformación inactiva. No obstante, en presencia de medios con interfaz hidrofóbica, las lipasas se absorben en la interfase en disposición de su conformación abierta y activa. A esta interacción de las lipasas se le denomina "mecanismo de activación interfacial". En dicha interfaz hidrófoba u oleosa aumenta la interacción enzima-sustrato, así mejorando sus propiedades como catalizadores enzimáticos (Fernández-Lafuente, 1998).

Una de las estrategias para optimizar el equilibrio conformacional de las lipasas en diferentes tipos de medios de reacción, es la inmovilización de estos biocatalizadores mediante el uso de diferentes tipos de soportes con propiedades hidrofóbicas. Basados en fenómenos como la adsorción interfacial usando un soporte de octil sefarosa (OC) o por unión covalente empleando un soporte de octil glioxil sefarosa (OC-GLX) se favorecer la actividad de las enzimas, además, el uso de estos soportes permite una gran facilidad en cuanto a la recuperación de las enzimas para su posterior reutilización, disminuyendo así costos operacionales (Fernández-Lorente et al., 2001; Hirata et al., 2016).

De acuerdo con todo lo anteriormente mencionado y como fundamento de esta investigación, a partir de la tributirina se puede obtener como producto el regioisómero 1,2dibutirina, molécula que genera interés desde el punto de vista químico y posee mayor valor agregado; empleando reacciones como la hidrolisis/metanólisis utilizando lipasas inmovilizadas. Durante la investigación se llevaron a cabo reacciones de hidrolisis/metanólisis de la tributirina con el fin de optimizar la producción de la 1,2-dibutirina empleando lipasas comerciales (Lipozyme RM IM y Novozyme 435) y derivados de las lipasas *Rhizomucor miehei* y *Candida antárctica B*, inmovilizados en octil sefarosa mediante el mecanismo de activación interfacial (OC-RML y OC-CALB), y octil glioxil sefarosa por el mecanismo de unión covalente (OC-GLX-RML y OC-GLX-CALB).

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Utilizar lipasas inmovilizadas en la reacción de metanólisis de la tributirina para la producción de 1,2-dibutirina.

1.2. Objetivos específicos

Realizar la inmovilización de lipasas microbianas de *Candida antarctica B* y *Rhizomucor miehei* en diferentes soportes de carácter hidrofóbico (adsorción interfacial y covalente).

Determinar la regioselectividad de los biocatalizadores preparados para la producción de 1,2-dibutirina mediante metanólisis de tributirina.

Comparar la producción de 1,2-dibutirina por medio de metanólisis de tributirina catalizada por lipasas inmovilizadas comercialmente de Novozyme 435 (CALB) y Lipozyme RM IM (RML).

2. Marco teórico

2.1. Lipasas

Las lipasas (glicerol-éster hidrolasas; EC 3.1.1.3) a nivel biológico son enzimas que catalizan las reacciones de hidrólisis de los triacilgliceroles (triglicéridos, TAG) que forman como productos ácidos grasos y glicerol, para su fácil absorción en el tracto digestivo en mamíferos (Kurtovic et al., 2009; González-Bacerio et al., 2010).

Las lipasas de origen fúngico generan mayor interés y para la industria se han convertido en una fuente significativa, puesto que, la enzima se encuentra extracelularmente; lo que genera una reducción en el costo de producción por un menor tratamiento para su obtención. Estas lipasas fúngicas se utilizan en procesos industriales: alimenticio, textil, biotecnológico, biomédico, cosmético, etc. (Ansorge-Schumacher y Thum., 2012; Mehta et al., 2017). Además, son muy versátiles, pueden participar como catalizadores en reacciones químicas de esterificación, transesterificación, alcohólisis, aminolisis, hidrolisis, etc. (Colla et al., 2015; Priji et al., 2016)

Las propiedades de las lipasas que generan interés para su estudio y aplicabilidad a escala de laboratorio e industria son: la especificidad, que se define como la afinidad al tipo de enlace, éster en la investigación en curso, para llevar a cabo la reacción. La regioselectividad: que es la habilidad de hidrolizar los grupos éster carboxílicos en las posiciones sn-1 y sn3, comparada a la posición sn-2 dentro de un triacilglicerol; y por último la enantioselectividad enzimática, lo que se refiere a la afinidad que poseen las lipasas por un tipo de enantiómero (R o S) en una mezcla racémica (Stránský et al., 2007; Casas-Godoy et al., 2012).

2.1.1. Estructura

Desde la última década del siglo pasado se ha estudiado la estructura de las lipasas mediante diferentes ensayos de cristalografía de rayos x, se ha demostrado que estas enzimas poseen un dominio estructural canónico compuesto por ocho cadenas beta unidas por hélices alfa conformando así una lámina beta, el núcleo central es el responsable de la actividad catalítica y define el plegamiento α/β hidrolasa; En la mayoría de lipasas el centro catalítico se encuentra cubierto por una o dos secuencias polipeptídicas de cadena corta con forma de hélice alfa conocida como tapadera o lid. (Uppenberg et al., 1994; Ericsson et al., 2008). El centro catalítico presenta una triada clásica de aminoácidos (Nucleófilo "Serina", Ácido "Ácido aspártico o glutámico" e Histidina) los cuales se encuentran ubicados en una cavidad conocida como "agujero del oxianión"; este bolsillo sirve como protector para el intermediario de reacción de la hidrolisis (Borrelli y Trono., 2015).

Diferentes estudios sobre lipasas han demostrado que estas enzimas en medio acuoso se encuentran en un equilibrio químico entre dos conformaciones estructurales, abierta y cerrada siendo esta ultima la más favorecida. En la conformación cerrada la tapadera se encuentra "protegiendo" el centro activo de la enzima, impidiendo el ingreso del sustrato e inhibiendo así la actividad catalítica de la lipasa. Por otro lado, en la conformación abierta la lid se encuentra desplazada permitiendo así el ingreso del sustrato al centro catalítico (Fernandez-Lafuente et al., 1998) El equilibrio conformacional de las lipasas se puede modificar en presencia de un sustrato, un inhibidor competitivo, o variando el medio con interfaces hidrófobas, etc.; favoreciendo la conformación con capacidad catalítica "conformación abierta"(Brzozowski et al., 1991; Reis et al., 2009).

2.1.2. Mecanismo de activación interfacial

Las esterasas al igual que las lipasas hidrolizan enlaces tipo éster en moléculas biológicas (Fojan et al., 2000). Pero existe una gran diferencia entre estos dos biocatalizadores, ya que, las lipasas presentan el mecanismo de activación interfacial; el cual se puede evidenciar experimentalmente como un aumento de la actividad enzimática cuando se alcanza el límite de solubilidad del sustrato, es decir, en presencia de una interfaz hidrofóbica. Esto ocurre debido a que las cadenas polipeptídicas de la lid en su cara interna presentan residuos con propiedades hidrofóbicas que al interactuar con la interfaz se desplaza favoreciendo la conformación abierta, permitiendo el ingreso del sustrato, activando la enzima (Brzozowski et al., 1991; González-Bacerio et al., 2010).



Figura 1: Mecanismo de activación interfacial de las lipasas (Tomado de Ruiz, 2012).

2.1.3 Inmovilización enzimática

La inmovilización enzimática ocurre cuando los residuos de aminoácidos de la enzima interactúan de forma química (iónica, covalente o hidrófoba) con diferentes soportes. Este proceso, la inmovilización, es la mejor opción para llevar las lipasas a escala industrial; debido a que permite el reciclaje de esta, se obtiene el producto libre de residuos enzimáticos, y en algunos casos ocurre el fenómeno de hiperactivación de la enzima permitiendo así un mayor rendimiento, brinda estabilidad a la enzima, se puede mejorar la enantio- y regio-especificidad, etc. (Al-Duri y Yong., 2000; C. González-Bacerio et al., 2010).

2.1.3.1 Inmovilización sobre soportes hidrófobos. Como ya fue mencionado anteriormente, las lipasas poseen una alta afinidad por interfaces hidrofóbicas. Por lo que la inmovilización sobre soportes con propiedades de este tipo es una buena opción, ya que es una inmovilización de tipo reversible y específica, además a bajas fuerzas iónicas las lipasas son las únicas proteínas que se adsorben, por lo cual este método es útil también para la purificación. En ese mismo orden de ideas, las lipasas han sido inmovilizadas en soportes activados con grupos hidrofóbicos

(octilo, fenilo, butilo, etc.) de agarosa mediante el mecanismo de activación interfacial lo que genera estabilidad de derivados y una activación enzimática convirtiéndola en un biocatalizador activo y en muchos casos ocurre una hiperactivación (Arroyo, 1998; Fernandez-Lafuente et al., 1998).



Figura 2: Equilibrio y adaptación de la lipasa inmovilizada por mecanismo de activación interfacial sobre soporte hidrofóbico (Arroyo, 1998).

Sin embargo, los derivados enzimáticos inmovilizados reversiblemente mediante el mecanismo de activación interfacial pueden presentar perdida de actividad debido a la desorción del biocatalizador cuando se trabajan en condiciones drásticas como: alta temperatura, presencia de detergentes, solventes orgánicos; por lo que a escala industrial no es de alta viabilidad y se opta por inmovilizaciones irreversibles como por ejemplo la de tipo de unión covalente (Mateo et al., 2006; Rodrigues et al., 2019).

2.1.3.2. Inmovilización sobre soportes covalentes. Este tipo de inmovilización se genera por la interacción nucleófilo-soporte, donde los nucleófilos, que son residuos de aminoácidos presentes en la cara externa de la enzima pueden unirse covalentemente de manera unipuntual o multipuntual a un soporte lo que le da mayor rigidez a la enzima, factor que altera la actividad enzimática (Arroyo., 1998).

La inmovilización por unión covalente genera mayor estabilidad enzimática, y permite la empleabilidad de los biocatalizadores en diferentes etapas industriales a causa de que posee mayor resistencia por la estabilización de la estructura terciaria proteica lo que previene la desactivación por efecto de la temperatura, el pH y la presencia de solventes orgánicos



Figura 3: Adaptación enzima inmovilizada por mecanismo de unión covalente: arriba unipuntual, abajo multipuntual (Arroyo, 1998).

2.1.4. Lipasa Candida antarctica B (CALB)

La CALB es una lipasa de origen fúngico y ha sido una de las lipasas más estudiadas y empleadas a nivel industrial (alimenticio, farmacéutico, químico, etc.) debido a su especificidad, alta regio/enantioselectividad y estabilidad en gran variedad de medios de reacción (Brzozowski et al., 1991). Su estructura fue resuelta por Uppenberg y colaboradores que determinaron la presencia de 317 residuos de aminoácidos con una estructura de plegamiento canónico α/β hidrolasa, con tres enlaces disulfuro y una triada catalítica clásica dentro del centro activo (Ser 105, Asp 187 y His 224) protegido por una lid. (Uppenberg et al., 1994)

Durante la catálisis, la CALB sufre un complejo cambio en su conformación, lo que genera una variación entre las conformaciones abierta y cerrada, donde el centro activo sufre cambios drásticos sin una activación interfacial significativa. (Skjøt et al., 2009; Ganjalikhany et al., 2012).

Comercialmente se puede encontrar la lipasa CALB inmovilizada en soporte hidrofóbico (Lewatit VP OC 1600 – resina de polímero acrílico macroporoso) con el nombre de NOVOZYME 435. Esta presentación de la CALB ha sido ampliamente utilizada en investigaciones y aplicaciones industriales a nivel mundial con foco en diferentes tipos de procesos químicos como: la producción y modificación de polímeros, producción de productos ópticamente puros, alcohólisis de glicéridos, esterificación de glicerol, interesterificación de glicerol, producción de biodiesel, etc.(Ortiz et al., 2019). De esta manera podemos evidenciar

que la CALB es ampliamente utilizada en procesos industriales con enfoque en la industria del biodiesel.

2.1.5. Lipasa Rhizomucor miehei (RML)

La RML es una lipasa de origen fúngico que ha sido ampliamente empleada en la industria alimenticia, en 1992, Derewendat y colaboradores resolvieron su estructura y determinaron que posee 269 residuos de aminoácidos con una triada catalítica con relación Ser 144, His 257 y Asp 203. (Derewendat et al., 1992)

Esta enzima presenta una alta estabilidad y especificidad, mediante varios estudios se ha reportado que es muy útil para la producción de compuestos con valor agregado como: biodiesel y compuestos enantioméricamente puros. (Tacias-Pascacio et al., 2016)

Lipozyme RM IM es la lipasa de RML inmovilizada, sobre una resina macroporosa de intercambio iónico, que se encuentra en el mercado comercial y es ampliamente utilizada en la industria para resolver compuestos quirales y procesos de transesterificación en la producción de biodiesel, también son altamente empleadas en las reacciones de esterificación e interesterificación de 1,3-digliceridos (Watanabe et al., 2003; Calero et al., 2014). De esta forma podemos evidenciar la versatilidad de la RML como biocatalizador con aplicabilidad en la industria del biodiesel.

2.2. Glicerol en la producción de biodiesel

El biodiesel es principalmente obtenido mediante la transesterificación de triacilgliceroles (TAG) de aceites vegetales, donde se produce glicerol como subproducto que en estado puro posee un valor entre 0.60 – 0.90/ lb durante una producción entre 500 y 700 toneladas/año (Werpy y Petersen, 2004). En los países que han introducido a gran escala el uso de este biocombustible han presentado problemas con la acumulación de glicerol donde el mayor inconveniente es la presencia de impurezas, lo que disminuye su valor agregado y razón por la cual debe ser purificado mediante diferentes métodos de alto costo (ultrafiltración utilizando membranas de polímeros orgánicos tratadas con resinas de intercambio iónico, electrodiálisis, etc.) para poder ser empleado en la industria; lo que genera un aumento de costo en la producción y por ende, en la mayoría de casos, es tratado como un desecho (Buenemann et al., 1991; Lourinho y Brito., 2015).

2.3. Diglicéridos: relevancia y obtención

A escala industrial los diacilgliceroles (DAG) son principalmente empleados en la producción de aceites y grasas comestibles, maduración de quesos, por otro lado, pueden ser utilizados en química fina como base para la producción de cosméticos y medicamentos (Gaschott et al., 2001; Ansorge-Schumacher y Thum., 2013; Manrique Vergara y González Sánchez., 2017). Los DAG suelen ser sintetizados mediante métodos de química orgánica lo que conlleva dificultades en la regioespecificidad del producto obtenido lo que es un problema en la industria farmacéutica que demanda productos regio y enantioisoméricamente puros, por métodos de síntesis orgánica se elevan los costos debido a una larga ruta de pasos de protección y desprotección de los centros moleculares activos (Lok., 1978).

La hidrolisis de triacilgliceroles (TAG) de origen vegetal para la producción de DAG era mediada por catálisis acida (altas temperaturas y altas presiones), dadas las condiciones tan drásticas se obtenían productos polimerizados y una gran diversidad de subproductos no deseados en mezcla con el producto final; razón por la cual se han implementado rutas de hidrolisis selectiva empleando rutas enzimáticas principalmente lipasas debido a su alta regio y enantioselectividad han sido introducidas en la industria para la producción de DAG a gran escala, evadiendo de esta forma la gran problemática de los subproductos e impurezas presentes en la materia final (C. González-Bacerio et al., 2010; Hernandez et al., 2011).

La 1,2-dibutirina (DAG) puede ser obtenida mediante la biotransformación de la tributirina (TAG) empleando lipasas siguiendo la reacción de metanólisis como se observa en la Figura 4.



Figura 4: Reacción de transesterificación por metanólisis de tributirina como sustrato.

Otro subproducto de reacción son las monobutirinas (1-monobutirina y 2monobutirina), la 2-monobutirina es el isómero directo de reacción catalizado por la lipasa y la 1-monobutirina es un producto de la migración de acilos, por lo cual, se encuentran en un equilibrio químico.

2. Materiales y métodos

3.1. Materiales y reactivos

Para la realización de esta investigación se emplearon las lipasas comerciales de la empresa Sigma-Aldrich, *Candida antarctica B* (CALB) y *Rhizomucor miehei* (RML). El soporte de Octil sefarosa CL-4B, el *para*-nitrofenilbutirato (*p*-NPB), la tributirina, el acetonitrilo, el metanol, el ácido butírico de grado analítico fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Los derivados enzimáticos comerciales Novozyme 435 y Lipozyme RM IM fueron donados por la empresa Coldaenzimas S.A.

El soporte de Octil glioxil sefarosa fue preparado previamente en el Grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología – GIBIM – de la Universidad Industrial de Santander.

3.2. Métodos experimentales

En la Figura 5 se puede identificar la ruta experimental de inmovilización de los derivados enzimáticos utilizados en las reacciones de metanólisis a lo largo del proyecto de investigación.



Figura 5: Curso experimental y biocatalizadores inmovilizados empleados en las reacciones enzimáticas.

3.2.1. Inmovilización de lipasas en soporte de Octil sefarosa por vía de activación interfacial

La inmovilización por este método se realizó a baja fuerza iónica utilizando una solución buffer de fosfato de sodio 5mM a pH 7 y dos gramos de soporte (Octil sefarosa) donde se mantuvo una relación volumétrica 1/10 entre el soporte y la solución enzimática (2.5 y 25mL respectivamente) (Fernandez-Lopez et al., 2015). Se tomaron muestras de la suspensión y el sobrenadante en intervalos de 15 minutos durante una hora y se midió la actividad hidrolítica versus *para*-nitrofenilbutirato (*p*-NPB) y se cuantificó la proteína presente en el medio por el método de Bradford.

Luego de una hora se filtró y lavó el derivado con abundante agua para remover toda la enzima no inmovilizada y se almacenó a una temperatura entre 4 - 8°C (Manoel et al., 2015; Hirata et al., 2016).

3.2.2. Inmovilización de lipasas en soporte de Octil glioxil sefarosa por unión covalente

La inmovilización sobre este tipo de soportes consiste en dos etapas: la primera es una inmovilización por adsorción (activación interfacial) y la segunda una inmovilización por unión covalente.

Una vez terminado el proceso de inmovilización por adsorción descrito en el numeral 3.2.1. empleando octil glioxil como soporte, se resuspendió el derivado en una solución amortiguadora 50mM de bicarbonato de sodio a pH 10 y se dejó en reposo durante 16 horas aproximadamente. Para finalizar, se adicionó a la solución 1mg/ml de borohidruro de sodio (NaBH₄), se agitó durante 30 minutos a 150rpm en un baño de hielo. Se filtró y lavó el derivado con abundante agua y se almacenó a 4-8°C (Rueda et al., 2015; Suescun et al., 2015).

3.2.3. Hidrolisis/Metanólisis de tributirina

Las reacciones de metanólisis se llevaron a cabo en medio acuoso según lo descrito por Hirata (2016) buscando la mejor relación de solventes agua/metanol (50%, 75% y 100%), para la optimización en la producción de 1,2-dibutirina; empleando los 4 derivados preparados en el laboratorio (OC-RML, 61 mg; OC-GLX-RML, 75 mg; OC-CALB, 25 mg; OC-GLX-CALB, 90 mg) y los 2 derivados comerciales (Novozyme 435, 83,5 mg y Lipozyme RM IM, 83,5 mg). Se preparó una solución 100mM de tributirina con solución buffer acetato de sodio 500mM a pH 5,5. Posterior se agregó el biocatalizador y fue agitado orbitalmente a 250rpm y 25°C. Periódicamente se agitó a 300 rpm, se tomaron muestras de 400 μ l con una micropipeta, empleando puntas desechables con punta cortada y se diluyó con dos volúmenes de metanol en un tubo Eppendorf, posteriormente, se centrifugó la solución por 1 minuto, tomando al sobrenadante de la solución como muestra para analizar por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

3.3. Métodos analíticos

3.3.1. Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford

Para la determinación de la concentración de proteína soluble se empleó el método colorimétrico de Bradford (Bradford et al., 1976). En 2.5mL de reactivo de Bradford se agregaron 25µL de solución enzimática, se dejó reaccionar por 12 minutos y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595nm, empleando 2.5mL de reactivo de Bradford con 25µL de solución amortiguadora 5Mm como blanco.

3.3.2. Medición de la actividad enzimática con la hidrolisis de p-nitrofenilbutirato

El ensayo se llevó a cabo midiendo en un espectrofotómetro UV-VIS en el modo "kinetica" el aumento de la absorbancia a 348nm durante un minuto. En un mililitro de solución amortiguadora de fosfato de sodio 25mM a pH 7 se agregaron 25µL de sobrenadante o suspensión extraídos en cada tiempo (0, 15, 30, 45 y 60 minutos) y 25µL de *p*-NPB. Esta metodología corresponde a lo descrito por Arana-Peña, Rueda y Manoel (Manoel EA et al., 2015; Rueda et al., 2015; Arana-Peña S et al., 2018)

3.3.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida – SDS PAGE en una dimensión

Con el fin de corroborar la inmovilización y purificación de las lipasas *Candida Antarctica B* y *Rhizomucor Miehei* utilizadas en los derivados preparados en el laboratorio, se realizó la electroforesis de estos y de los extractos enzimáticos puros, siguiendo lo descrito por Laemmli, y Kang, et al. (Laemmli et al., 1970; Kang et al., 2002).

3.3.3.1. Preparación de los geles. Se realizó el montaje de los vidrios y se vertió el gel de separación con un 12 % de acrilamida. Inmediatamente vertido el gel se agregó una pequeña capa de solución isopropanol al 60 % en la parte superior del gel. Posterior a la polimerización del gel de separación se agregó el gel de concentración, que se encuentra al 4 % de acrilamida, inmediatamente se posiciona el peine en el gel de concentración con el fin de crear los pozos de siembra para el posicionamiento de las proteínas a separar. Al polimerizar el gel de concentración, retirar el peine y limpiar los pozos con papel filtro.

3.3.3.2. Preparación de las muestras. Se tomaron muestras tanto de los derivados inmovilizados, como de los extractos comerciales de la siguiente manera: 10 mg de los derivados de RML, 5 mg de los derivados de CALB y 10 μ L de los extractos comerciales. A las muestras se les adicionaron 10 μ L de buffer de carga o ruptura (Buffer de Laemmli), se llevaron las muestras a 100 °C por 5 minutos, luego se centrifugaron y se tomaron 4 μ L del sobrenadante y depositados en los pozos presentes en el gel de concentración. Finalmente se sembró en un pozo aparte el marcador de peso molecular MWP07 Nippon Genetics Marker (10 – 200 KDa).

Usando el equipo (Miniprotean Biorad, Hercules, USA) se aplicó un voltaje de 100 V durante aproximadamente 1 hora.

3.3.3.3. Tinción con el método de azul de Coomassie. Se empleo una solución de tinción al 50 % metanol, 10 % ácido acético y 0.25 % de azul de Coomassie R 250 con el fin de colorear las zonas proteicas presentes en el gel. Posterior a la coloración se retiró la solución y se agregó una solución decolorante fuerte, después de 30 minutos, se retiró la solución fuerte y se adicionó una solución decolorante débil. Una vez se observaron las bandas de la separación de las proteínas y el fondo del gel era claro, se procedió a escanear y analizar el resultado de la electroforesis.

3.3.4. Análisis de muestras por cromatografía de alta eficiencia HPLC en fase reversa

El análisis de las muestras, provenientes de la hidrolisis/metanólisis de la tributirina, por RP-HPLC se realizó según lo descrito por Hirata y colaboradores, empleando un cromatógrafo con detector de arreglo de diodos (DAD) a 210nm utilizando una columna C-18 (5µm, 250 x 4.6mm) y temperatura de columna de 30°C (Hirata et al., 2016). El método empleó un gradiente (Apéndice C) de acetonitrilo/agua con relación máxima 60:40 y duración de 60 minutos a un flujo de 1 mL/min.

3.3.5. Cálculo de la actividad hidrolítica para tributirina

Para la cuantificación de producto obtenido se utilizó el % de conversión a producto deseado, utilizando el área del cromatograma de la tributirina como base y los factores de respuesta de las monobutirinas y dibutirinas, según lo descrito por Hirata y colaboradores (Hirata et al., 2016). Y está descrito matemáticamente en la ecuación 2.

Ecuación 1

Ecuación 2

$$\% Conversión = \frac{(Compuesto a calcular * 100)}{\acute{A}rea Total}$$

Para determinar la regioselectividad de la reacción en un instante t en la formación de la 1,2-dibutirina de los preparados enzimáticos, se utilizó la **ecuación 3**.

Ecuación 3

% regioselectividad a 1,2 - dibutirina =
$$\frac{\% \text{ conversión } 1,2 - DAG}{\sum \% \text{ conversión } DAG (1,2 y 1,3)} * 100$$

Los tiempos analizados fueron en donde el porcentaje de conversión a 1,2-dibutirina eran los máximos.

4. Resultados y discusión

4.1. Inmovilizaciones de las lipasas *Candida Antarctica B* y *Rhizomucor Miehei* en soportes hidrófobos

4.1.1. Inmovilización de las lipasas Candida antarctica B y Rhizomucor miehei por activación interfacial empleando Octil sefarosa [OC] como soporte

Dadas las condiciones de inmovilización descritas en el Método 4.2.1. En la Figura 6a se describe la cinética de inmovilización de la CALB en octil sefarosa. Se determinó que la actividad residual final del derivado en suspensión es del 74,4% transcurridos 60 minutos de incubación, en comparación con la actividad del extracto enzimático crudo. La CALB presenta una actividad inferior a la actividad del extracto enzimático puro, esto debido a una posible alteración en la estructura de la conformación activa de la enzima durante la adsorción de estas sobre el soporte de octil sefarosa lo que esta descrito por investigaciones anteriores (Rotticci et al., 2000; Skjøt et al., 2009).



Figura 6. a) Cinética de inmovilización sobre soportes de octil sefarosa de la lipasa *Candida Antarctica B*. Línea azul: Sobrenadante. Línea naranja: Suspensión. b) Porcentaje de proteína (CALB) inmovilizada en función del tiempo.

Además, mediante la Figura 6b se observó una rápida adsorción de la enzima, inmovilizando un 84,8 % de la proteína transcurridos 15 minutos de incubación. Resultado que concuerda con investigaciones anteriores que reportaron velocidades rápidas de adsorción de la *Candida Antarctica B* en soportes hidrofóbicos (Rueda et al., 2015; Hirata et al.,2016; Arana-Peña et al., 2019). Además, se destaca la cantidad de proteína inmovilizada sobre el soporte de octil sefarosa; llegando a adsorber un 90 % de la proteína total en el medio. Como fue descrito por Uppenberg y demás investigaciones, la *Candida Antarctica B* posee una tapadera significativamente más pequeña que varias lipasas (Uppenberg et al., 1994; Khan et al., 2017), lo que aumenta la probabilidad de interacción entre el soporte y la enzima, dada la baja fuerza iónica del medio de inmovilización, facilitando de esta manera la adsorción mediante el mecanismo de activación interfacial (Fernandez-Lopez et al., 2015).

Por su parte, la *Rhizomucor Miehei* al ser inmovilizada bajo las mismas condiciones permitió identificar mediante la cinética de inmovilización, Figura 7a, después de 60 minutos de iniciada la inmovilización una hiperactivación del 114,6% en la actividad residual del derivado respecto a la actividad de la enzima pura; esta hiperactivación está relacionada con la baja fuerza iónica en el medio de reacción que genera condiciones óptimas para la inmovilización de la lipasa sobre el soporte, de manera que estéricamente favorece la disposición de la proteína aumentando su actividad residual (Derewenda et al., 1992; Al-Duri., 1999; Hirata et al., 2016; Arana-Peña et al., 2019).



Figura 7. a) Cinética de inmovilización de *Rhizomucor Miehei* en el soporte octil sefarosa. Línea naranja: Suspensión. Línea azul: Sobrenadante. b) Porcentaje de proteína (RML) inmovilizada en octil sefarosa en función del tiempo.

Con base en la Figura 7b, se determinó que el porcentaje de la lipasa RML inmovilizada usando Octil sefarosa como soporte fue del 21,8%, transcurridos 60 minutos de inmovilización. Este bajo porcentaje de proteína inmovilizada está relacionado con el tamaño de la tapadera de la lipasa de *Rhizomucor Miehei*, la cual es suficientemente grande para proteger el centro catalítico en su totalidad (Derewendat et al., 1992), dificultando la interacción de la lid con el medio de baja fuerza iónica lo que disminuye la interacción enzima soporte y dificulta la adsorción de la proteína (Fernandez-Lopez et al., 2015).

4.1.2. Inmovilización por unión covalente de las lipasas Candida antarctica B y Rhizomucor Miehei empleando Octil-glioxil sefarosa [OC-GLX]



Figura 8. a) Cinética de inmovilización de *Candida Antarctica B* en el soporte octil glioxil sefarosa. Línea verde: Sobrenadante. Línea naranja: Suspensión. b) Porcentaje de proteína (CALB) inmovilizada en octil glioxil sefarosa en función del tiempo.

Dadas las condiciones de inmovilización del biocatalizador descrita por el Método 4.2.2. en la Figura 8a se describe la cinética de inmovilización de la CALB en octil glioxil sefarosa, en donde se observa una actividad residual del 98,74% en comparación a la actividad del biocatalizador sin inmovilización transcurridos 60 minutos de incubación, antes de la reducción con borohidruro de sodio [NaBH4] que genero la unión de tipo covalente. Se identifico un comportamiento similar al reportado por Arana-Peña y Rueda en porcentaje de actividad residual en la inmovilización de CALB en octil glioxil agarosa (Rueda et al., 2015; Arana-Peña et al., 2018). En donde se evidencia una leve reducción en la actividad residual debido a alteraciones en la conformación abierta de la enzima que se encuentra adsorbida en el soporte (Skjøt et al., 2009). En esta inmovilización se observa un porcentaje de proteína inmovilizada del 64.7%, Figura 8b, transcurridos 60 minutos de incubación; un porcentaje menor al adsorbido por la inmovilización empleando como soporte la octil-sefarosa. Esto puede darse por la estructura del soporte, ya que algunos de los grupos octilo fueron oxidados a grupos glioxilo, generando una disminución de grupos octilo disponibles para la interacción hidrofóbica que se da a pH 7 (Rueda et al., 2015; Hirata et al., 2016b).



Figura 9. a) Cinética de inmovilización de *Rhizomucor Miehei* en el soporte octil sefarosa. Línea verde: Suspensión. Línea azul: Sobrenadante. b) Porcentaje de proteína (RML) inmovilizada en octil sefarosa en función del tiempo.

En la Figura 9a, se observa la cinética de inmovilización de la RML en octil glioxil sefarosa con un porcentaje de actividad de 126.3% del derivado respecto a la actividad del extracto enzimático puro, resultado que coincide con estudios realizado previamente (Hirata et al., 2016b). Este fenómeno de hiperactivación se da debido a la baja fuerza iónica utilizada para la inmovilización, permitiendo que la lipasa inmovilizada se adsorba en una conformación abierta y activa con disposición óptima para llevar a cabo la reacción de hidrolisis de *p*-NPB (Fernandez-Lopez et al., 2016). También, mediante la Figura 9b se determinó un porcentaje de 12,8% de RML inmovilizada posterior a 60 minutos de incubación. Este bajo porcentaje de proteína inmovilizada se debe a la disminución de los grupos octilo del soporte por la oxidación a glioxilo (Derewendat et al., 1992; Al-Duri et al., 1999).

4.2. Análisis de los derivados enzimáticos preparados en laboratorio por electroforesis SDS-PAGE

En la ilustración 6 se observa el gel de electroforesis obtenido en laboratorio, donde se observan, en las líneas 2 y 5 los extractos comerciales de las lipasas *Rhizomucor Miehei* y *Candida Antarctica B* y en ellos las bandas con pesos moleculares de 31 y 33 KDa correspondientes a cada enzima respectivamente, pesos moleculares descritos por Derewendat y Uppenberg (Derewendat et al., 1992. Uppenberg et al., 1994). Además, en las líneas 2 y 5 se puede observar la presencia de más bandas que corresponden a impurezas y esterasas presentes en estos extractos comerciales.



Figura 10: Análisis mediante SDS-PAGE de los extractos enzimáticos puros y los derivados enzimáticos preparados en laboratorio de las lipasas Candida Antarctica B y Rhizomucor Miehei. De izquierda a derecha; Línea 1: Marcador de peso molecular MWP07 Nippon Genetics Marker (10 – 200 KDa), línea 2: Extracto de Rhizomucor Miehei, Línea 3: OC-RML, Línea 4: OC-GLX-RML, Línea 5: Extracto de Candida Antarctica, Línea 6: OC-CALB y Línea 7: OC-GLX-CALB.

En los derivados de OC-RML (línea 3) y OC-CALB (línea 7) se identificaron únicamente las bandas con pesos moleculares de 31 y 33 KDa respectivamente, lo que evidencia la inmovilización y purificación de las lipasas mediante el mecanismo de activación interfacial sobre los soportes de octil sefarosa.

Continuando con los derivados de OC-GLX-RML (línea 4) y OC-GLX-CALB (línea 8) se identificaron con bandas más tenues y delgadas lo que corresponde a la cantidad de enzima

adsorbida reversiblemente sobre el soporte mediante el mecanismo de activación interfacial que es aproximadamente el 10 %, lo que indica que la mayoría de las moléculas, se mantienen inmovilizadas mediante el mecanismo de unión covalente al soporte de octil glioxil sefarosa (Rueda et al., 2015; Arana-Peña et al., 2019)

4.3. Reacción de metanólisis empleando los derivados inmovilizados de OC-CALB, OC-RML, OC-GLX-CALB y OC-GLX-RML

4.3.1. Reacción de metanólisis (50 % de metanol)

En la Figura 11a se observó que los derivados OC-CALB y OC-RML presentan una alta especificidad de sustrato, debido a que el porcentaje de 1,2-dibutirina obtenido llegó a un máximo de, 32,9 y 51,1 % respectivamente. Resultados que concuerdan con los descritos por Hirata y colaboradores (2016) en reacciones con condiciones similares empleando los derivados inmovilizados en octil y octil glioxil agarosa haciendo uso de otros alcoholes (etanol e isopropanol) en el medio de reacción. (Hirata et al., 2016). También se indica una alta selectividad enzimática por la tributirina, al mantener los porcentajes de conversión a la 1,2-dibutirina constantes a lo largo del tiempo de reacción.

Por otro lado, en la Figura 11b se observa que tanto el derivado OC-CALB como el derivado de OC-RML formaron el isómero 1,3-dibutirina en un porcentaje de 2,3 y 3,3 % respectivamente; resultado que nos indica una alta regioselectividad de reacción, favoreciendo la formación del isómero 1,2- de la dibutirina. Investigaciones anteriores sustentan que las lipasas de CALB y RML son enzimas 1,3- especificas, o sea, que reaccionan en la hidrolisis del carbono 1 o 3 de un triacilglicerol, en este caso la tributirina (Takwa et al., 2010); pero que por afectaciones en la conformación natural de la lipasa durante la inmovilización pueden ver su especificidad de reacción levemente afectada, razón por la cual se puede estar presentando la formación del isómero 1,3 de la dibutirina (Hirata et al., 2016).

Continuando con los derivados de OC-GLX-CALB y OC-GLX-RML, en la Figura 11a se destacan los porcentajes máximos de conversión a 1,2-dibutirina de 50,7 y 53 % respectivamente a 60 minutos de reacción. A diferencia de los derivados inmovilizados en octil sefarosa que produjeron 51,1 % y 32,9 %, estos derivados inmovilizados de manera irreversible presentan perdida en la selectividad enzimática ya que el porcentaje de 1,2-dibutirina comienza a disminuir a lo largo del tiempo de reacción, lo que significa que el derivado enzimático está utilizando el diacilglicerol como sustrato para su transesterificación. Este cambio en la selectividad enzimática ya que la enzima presenta mayor afinidad por un

sustrato con más polaridad, en este caso, la dibutirina (Hirata et al., 2016); por eso, en la Figura 11a se observa una pendiente negativa en las curvas de los derivados de OC-GLX-CALB y OC-GLX-RML desde el minuto 60 hasta el 240.



Figura 11. Cinética de hidrolisis/metanólisis (al 50 % de metanol) de la tributirina utilizando los cuatro derivados inmovilizados en el laboratorio a) Producción de 1,2-dibutirina. b) Producción de 1,3-dibutirina.

En cuanto a la selectividad de reacción de estos dos derivados inmovilizados de manera irreversible, podemos observar en la Figura 11b, la formación de 1,3-dibutirina con un máximo porcentaje de conversión de 3,1 % para el OC-GLX-CALB y del 2,9 para el OC-GLX-RML. Por lo que se indica una alta regioselectividad para la conversión a 1,2-dibutirina por parte de los derivados; debido al bajo porcentaje de conversión al isómero 1,3. Este cambio en la regioselectividad en la formación de isómeros, está dado por las condiciones de inmovilización, que a baja fuerza iónica y pH alcalino modifican la conformación natural de la enzima al momento de ser inmovilizada (Hernandez et al., 2011; Hirata et al., 2016).

4.3.2. Reacción de metanólisis (75 % de metanol)

Al 75 % de metanol en el medio de reacción los derivados de OC-RML y OC-GLX-RML muestran, Figura 12b, una alta selectividad de reacción al no formar el isómero 1,3dibutirina; además, en la Figura 12a se observa una alta especificidad de sustrato al mantener el porcentaje de conversión máximo desde el minuto 30 de comenzada la reacción. Sin embargo, este porcentaje de conversión es bajo, 23,8 % para el OC-RML y 6,5 % para el OC-GLX-RML a comparación del porcentaje producido en la reacción con concentración de metanol al 50 %, que fue de 48,3 y 53 % respectivamente. Por lo que se infiere una inhibición de la lipasa *Rhizomucor Miehei*, a razón de la concentración del alcohol. A mayor porcentaje de metanol en el medio de reacción menor actividad en la reacción de metanólisis para la transesterificación de tributirina en 1,2-dibutirina o dibutirinas en general (Hirata et al., 2016).



Figura 12. Cinética de hidrolisis/metanólisis (al 75 % de metanol) de la tributirina utilizando los cuatro derivados inmovilizados en el laboratorio a) Producción de 1,2-dibutirina. b) Producción de 1,3-dibutirina.

En cuanto a los derivados de OC-CALB y OC-GLX-CALB, se observa en la Figura 12a un porcentaje máximo de conversión a 1,2-dibutirina de 48,7 y 45,6 % respectivamente en tiempo a reacción de 30 minutos. Ambos derivados presentan una perdida en la especificidad de sustrato a la hora de llevar a cabo la reacción de metanólisis, esto se deduce debido a que el porcentaje de conversión máximo disminuye hasta un 42,5 % para el OC-CALB y un 28,9 % para el OC-GLX-CALB; lo que indica que el derivado utiliza las dibutirinas como sustrato de reacción.

Además, ambos derivados presentan formación de 1,3-dibutirina como se contempla en la Figura 12b, con un porcentaje de conversión a 1,3-dibutirina de 3,2 % para el OC-CALB y de 3,35 % para el OC-GLX-CALB a 30 minutos de reacción. Por lo que se indica que los derivados de la lipasa *Candida Antarctica B*, presentan una baja perdida en la selectividad de reacción al presentar la formación del isómero 1,3-dibutina. Hirata y colaboradores afirman que la formación del isómero 1,3 de la dibutirina está relacionada con la afectación en la conformación activa de la lipasa en el momento de su inmovilización y no por la migración de un grupo butirato de la 1,2-dibutrina estabilizándose en 1,3-dibutirna (Camacho-Ruiz et al., 2015; Hirata et al., 2016).

4.3.3. Reacción de metanólisis (100 % de metanol)

Al utilizar un medio de reacción totalmente alcohólico, 100 % de metanol, se obtuvieron los resultados observados en la Figura 13a para la conversión a 1,2-dibutirina, en donde se puede determinar que los derivados de OC-CALB, OC-RML y OC-GLX-RML se ven inhibidos en su actividad por la alta concentración del alcohol obteniendo un porcentaje máximo de conversión a 1,2-dibutirina del 4,4, 3,2 y 0,7 % respectivamente. Esta inhibición enzimática se da por la alta concentración de metanol, la enzima al no tener agua en el medio de reacción

presenta cambios en su conformación activa lo que altera su actividad enzimática (Petkar et al., 2006; Adlercreutz et al., 2013).



Figura 13. Cinética de hidrolisis/metanólisis (al 100 % de metanol) de la tributirina utilizando los cuatro derivados inmovilizados en el laboratorio a) Producción de 1,2-dibutirina. b) Producción de 1,3-dibutirina.

Por su parte, el derivado de OC-GLX-CALB presenta un porcentaje máximo de conversión a 1,2-dibutirina del 46 % a las cuatro horas de comenzada la reacción. Este resultado es bastante novedoso empleando metanol como medio de reacción, debido a que Hirata y colaboradores al utilizar medios de reacción anhidros de isopropanol y etanol, presentaban perdidas en la actividad enzimática a bajas concentraciones (100mM) de sustrato (tributirina) y descartaron el uso de metanol debido al bajo porcentaje de conversión a 1,2-dibutirina, en comparación al obtenido con los alcoholes antes mencionados (Hirata et al., 2016).

Por otro lado, se observa, en la Figura 13a, una alta especificidad de sustrato al no utilizar la dibutirina como sustrato, manteniendo así, el porcentaje de 1,2-dibutirina estable y aumentando a lo largo de las cuatro horas de reacción. Además, en la Figura 13b, se observa la formación de la 1,3-dibutirina con un porcentaje (3,2 %) máximo de conversión a los 120 minutos de iniciar la reacción; por lo que, al comparar los porcentajes de producción de las dibutirinas se infiere una alta regioselectividad de la reacción en la formación de la 1,2-dibutirina por parte del sustrato. Investigaciones anteriores destacan que tanto la selectividad enzimática como la regioselectividad de reacción de los derivados enzimáticos de lipasas, están relacionadas con las condiciones empleadas en las rutas de inmovilización de estos derivados (Stránský et al., 2007; Barbosa et al., 2012; Rodriguez et al., 2019), y con las condiciones de reacción que evitan el desplazamiento a la formación al isómero termodinámicamente más estable, la 1,3-dibutirina, al mantener el pH del medio en 5,5 (Hernandez et al., 2011).

Para concluir, se pudo evidenciar que la inmovilización de la lipasa CALB en el soporte heterofuncional de octil glioxil sefarosa le confirió estabilidad a la enzima para reacciones en condiciones drásticas: pH 5,5, baja fuerza iónica y metanol 100. Siendo este último, el factor a tomar en cuenta para la investigación.

4.4. Reacción de metanólisis empleando los derivados comerciales Novozyme 435 y Lipozyme RM IM

Con base en los resultados obtenidos en las reacciones donde se utilizaron los derivados inmovilizados en el laboratorio se optó por: para el derivado de RML, Lipozyme RM IM se evaluó en las concentraciones de metanol de 50 y 75 %, ya que al 100 % de metanol los derivados de laboratorio no presentaban una actividad significativa. Para el derivado de CALB, Novozyme 435, se evaluó en las concentraciones de metanol de 75 y 100 %, debido a que fueron las relaciones donde mejor porcentaje de conversión a 1,2-dibutirina presentaron los derivados preparados en el laboratorio.



4.4.1. Lipozyme RM IM

Figura 14. a) Cinética de reacción en la producción de 1,2-dibutirina. b) Cinética de reacción en la producción de 1,3-dibutirina, empleando el derivado comercial Lipozyme RM IM, en medios de reacción del 50 % (línea amarilla) y 75 % (línea naranja) de metanol.

Mediante la Figura 14a se pudo determinar que el derivado comercial de la RML presenta un porcentaje máximo de conversión a 1,2-dibutirina del 30,3 %. también, presenta una alta especificidad de sustrato, al mantener y aumentar el porcentaje de 1,2-dibutirina presente en el medio. Además, se presenta el mismo fenómeno en la producción de la 1,3-dibutirina (Figura 14b) con un porcentaje máximo de conversión a 1,3-dibutirina del 2,1 %.

Cuando la reacción se llevó a cabo en un medio de reacción con un 50 % de metanol se identificó mediante la Figura 14a, una mejora en la actividad enzimática respecto a la actividad mostrada en el medio con 75 % del alcohol. Al presenta un porcentaje máximo de conversión

a 1,2-dibutirina de 35,9 % comparado con el 30,3 % en el medio al 75 % de metanol. Sin embargo, mediante la Figura 14a también se puede determinar que el derivado comercial de la RML presenta una perdida en la especificidad de sustrato, esto debido al consumo de las dibutirinas como reactivo (Figura 14).

Calero y colaboradores describieron que el derivado comercial Lipozyme RM IM presenta porcentajes máximos de conversión a diacilgliceroles del 29,6 % mediante la reacción de etanólisis (Calero et al., 2014).



4.4.2. Novozyme 435

Figura 15. a) Cinética de reacción en la producción de 1,2-dibutirina. b) Cinética de reacción en la producción de 1,3-dibutirina, empleando el derivado comercial Novozyme 435, en medios de reacción del 75 % (línea azul) y 100 % (línea verde) de metanol.

El derivado comercial de la CALB presenta una mejor estabilidad en la conversión a 1,2-dibutirina empleando una relación de 100 % de metanol en el medio de reacción. Su especificidad de sustrato es alta, y se observa en la Figura 15a al mantener el porcentaje de conversión a 1,2-dibutirina elevado (30 %) y estable en el tiempo, por otro lado, la reacción empleando 75 % de metanol en el medio de reacción presenta una baja especificidad de sustrato, debido a que al momento de llegar al máximo porcentaje de conversión (20 %) a 1,2-dibutirina, línea azul en Figura 15a comienza a descender, esto significa que la lipasa está utilizando el producto deseado de reacción como sustrato para una nueva reacción de transesterificación, formando así monobutirinas, Figura 4. En la Figura 15b se puede evidenciar un comportamiento similar para la 1,3-dibutirina.

4.5. Comparación de la regioselectividad de reacción y la especificidad de sustrato por parte de los derivados preparados en laboratorio OC-CALB, OC-RML, OC-GLX-CALB y OC-GLX-RML y los derivados comerciales Novozyme 435 y Lipozyme RM IM

Al comparar la Figura 14, se puede evidenciar una elevada selectividad del derivado comercial Lipozyme RM IM, debido a que el porcentaje máximo de conversión a 1,2-dibutirina tanto a 50 % y 75 % de metanol es significativamente mayor 35,9 % y 30,3 % respectivamente, que el porcentaje máximo de conversión a 1,3-dibutirina (2,2 % y 2 %). Por lo que podemos indicar, mediante la ecuación 3, que la regioselectividad del Lipozyme RM IM favorece la formación de 1,2-dibutirina con porcentajes de formación de 94,3 % a 50 % de metanol en el medio y del 93,8 % al 75 % de metanol. Los resultados obtenidos tienen sentido a investigaciones anteriores donde se han reportado que la lipasa de *Rhizomucor Miehei* son enzimas con selectividad en la hidrolisis de los enlaces éster de las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de los triacilgliceroles, favoreciendo así la formación de los 1,2-diacilgliceridos (Stránský et al., 2006).

Derivado	Tiempo de reacción [min]	Conversión a 1,2-dibutirina [%]	Conversión a 1,3-dibutirina [%]	Regioselectividad de reacción a 1,2-dibutirina [%]	Especificidad de sustrato
50 % Metanol					
Lipozyme RM IM	60	35,9	2,2	94,3	Baja
OC-RML	120	51,8	3,4	93,8	Alta
OC-GLX-RML	60	53	3	94,7	Baja
75 % Metanol					
Lipozyme RM IM	240	30,4	2	93,8	Alta
OC-RML	30	23,9	0	100	Alta
OC-GLX-RML	30	6,1	0	100	Alta
Novozyme 435	30	20	1,2	94,8	Baja
OC-CALB	30	48,7	3,2	93,8	Alta
OC-GLX-CALB	30	45,6	3,3	93,2	Baja
100 % Metanol					
Novozyme 435	30	34,4	1,4	96,1	Baja
OC-GLX-CALB	240	45,9	3,1	93.7	Alta

Tabla 1. Comparativa de los derivados enzimáticos en cuanto a su regioselectividad de reacción y especificidad de sustrato en relación con el porcentaje de metanol en el medio de reacción.

En cuanto al análisis de la regioselectividad de la reacción empleando los diferentes derivados evaluados en un medio de reacción al 50 % de metanol, se puede evidenciar en la Tabla 1, que el derivado comercial Lipozyme RM IM presenta un porcentaje de regioselectividad a 1,2-dibutirina del 94,3 %, pero, presenta perdida en la especificidad de sustrato como se puede evidenciar en la Figura 14. Por otro lado, el derivado de OC-RML que presenta una alta especificidad por la tributirina como sustrato mostrando el no consumo de dibutirinas como sustrato, presenta un elevado porcentaje de conversión al isómero 1,2 (51,8 %) y además un alto porcentaje de regioselectividad en la formación de dicho isómero (93,8).

Continuando con el derivado de OC-GLX-RML, a 60 minutos de iniciada la reacción se presenta el máximo porcentaje de conversión a 1,2-dibutirina, 53 % siendo el derivado que mayor porcentaje alcanza, además, presenta una regioselectividad de reacción del 94,7 % en la formación del isómero 1,2 de la dibutirina. Sin embargo, su especificidad de sustrato afecta la producción del producto deseado al consumirlo como sustrato desde el minuto 60. Este cambio en la selectividad de la enzima está relacionado con la polaridad del producto formado y la afinidad del centro catalítico por las dibutirinas; las dibutirinas al presentar mayor polaridad que la tributirina pueden interactuar con mayor facilidad con los aminoácidos polares presentes en el centro catalítico de la lipasa aumentado la interacción dibutirina-lipasa y disminuyendo la interacción tributirina-lipasa (Barbosa et al., 2012; Fernandez-Lopez et al., 2016).

Por su parte, los derivados de la *Rhizomucor Miehei* cuando la reacción se llevaba a cabo en un medio con 75 % de metanol, presentados en la Tabla 1 indican que: el derivado comercial Lipozyme RM IM, presenta su máximo porcentaje de conversión a 1,2-dibutirina, 30,4 %, posterior a 240 minutos iniciada la reacción. Además, su regioselectividad es elevada con un 93,8 % de favorabilidad de formación al isómero 1,2. Esta disminución en la actividad enzimática está relacionada con la baja relación de agua en el medio de reacción; donde hay mayor porcentaje de alcohol, la lipasa se ve deshidratada y altera su conformación activa (Hirata et al., 2016).

Los derivados de OC-RML y OC-GLX-RML, por su parte presentan un porcentaje de regioselectividad de 100 %, a la formación del isómero 1,2 de la dibutirina; pero, con un bajo porcentaje de conversión a 1,2-dibutirina. Cabe resaltar que tanto los derivados preparados en laboratorio como el derivado comercial de la RML presentan una alta especificidad de sustrato a lo largo de toda la reacción.

La regioselectividad en la formación de la 1,2-dibitirina se puede definir al comparar (Figura 13) los porcentajes de conversión máxima obtenidos en la producción entre los dos isómeros estructurales, 1,2 y 1,3-dibutirina. Al 75 % de metanol en el medio, el Novozyme 435 presentó un porcentaje máximo de conversión a 1,3-dibutirina, del 1,1 % y un porcentaje a

1,2-dibutirina del 20 % lo que indica una favorabilidad del 94,8 % en la formación del isómero 1,2.

Cuando se utilizó un medio totalmente alcohólico se formó un porcentaje máximo a 1,3dibutirina de 1,6 % a 2 horas de reacción, para ese mismo tiempo el porcentaje de 1,2-dibutirina era de 29,3 % lo que nos indica una favorabilidad en la formación del isómero 1,2 de 94,8 %. Por lo que demostramos que la regioselectividad del Novozyme 534 favorece la formación del isómero 1,2 de la dibutirina con un porcentaje de 94, 8 %.

De acuerdo con los datos obtenidos y analizados en la sección, se puede concluir en la Tabla 1 que en presencia de 75 % de metanol en el medio, los derivados de la *Candida Antarctica B* preparados en laboratorio, presentan un mayor porcentaje de conversión máximo a 1,2-dibutirina y en el caso de la OC-CALB se mejora su especificidad de sustrato al no utilizar el producto deseado para seguir reaccionando (Figura 12a). La única diferencia es que el derivado Novozyme 435, presenta una mejor regioselectividad, 94,8 % en la favorabilidad de formación a 1,3-dibutirina; pero no es significativamente mayor al presentado por los derivados de OC-CALB y OC-GLX-CALB, 93,8 y 93,2 % respectivamente.

En cuanto la regioselectividad de los derivados probados en medios de reacción al 100 % de metanol, se observa en la Tabla 1 que el derivado comercial presenta una leve superioridad en la regioselectividad de reacción de 2,4 % en la formación del isómero 1,2 de la dibutirina respecto a la regioselectividad de la OC-GLX-CALB. Sin embargo, el derivado de OC-GLX-CALB presenta un porcentaje de conversión a 1,2-dibutirina máximo de 45,9 % que es un 11,5 % superior al porcentaje presentado por el derivado Novozyme 435. Por otro lado, el derivado preparado en laboratorio presenta una mejor especificidad de sustrato, como se observa en la Figura 13, al no utilizar las dibutirinas como sustrato para conllevar reacciones de transesterificación. Estas diferencias en la selectividad enzimática y la regioselectividad de reacción se debe a las diferentes condiciones de inmovilización de los derivados (Barbosa et al., 2012; Rodrigues et al., 2019).

Conclusiones

Fue factible la inmovilización de las lipasas Candida Antarctica B y Rhizomucor Miehei en los soportes de octil sefaroca y octil glioxil sefarosa. Además, se estableció que la estabilidad de los derivados enzimáticos preparados en laboratorio se pudo ver afectada de acuerdo con: las condiciones de los protocolos de inmovilización, el cambio en las condiciones de reacción; como la relación de metanol en el medio de reacción, el tipo de mecanismo de inmovilización (unión covalente o activación interfacial) y la naturaleza del soporte.

Se determinó que los derivados de OC-GLX-CALB, OC-CALB y OC-RML (50 %, 75 % y 100 % de metanol) presentan 93,7 %, 93,8 % y 93,8% de regioselectividad de formación a 1,2-dibutirina respectivamente. Además, estos derivados exhiben superioridad en la actividad enzimática, regioselectividad de formación al isómero 1,2 de la dibutirina y especificidad de sustrato; sobre los derivados comerciales Novozyme 435 y Lipozyme RM IM bajo las mismas condiciones de reacción de metanólisis de tributirina en la biotransformación a 1,2-dibutirina.

Recomendaciones

Es relevante encontrar un método de separación óptimo de los productos de reacción, tanto de las dibutirinas como del butirato de metilo formado durante la reacción, debido a que es un subproducto con aplicabilidad a escala industrial. El butirato de metilo es utilizado como aromatizante en productos de aseo y puede ser empleado en la producción de biodiesel y tributirina.

Se considera la posibilidad de emplear cosolventes apolares, como el n-hexano, para generar interfases hidrófobas más marcadas y así posiblemente mejorar las actividades de los derivados enzimáticos.

También se pone a consideración la inmovilización de agregados enzimáticos bimoleculares de la lipasa *Rhizomucor Miehei*, que posibilitan una mejora en la actividad de los derivados inmovilizados.

Referencias bibliográficas

- Adlercreutz, P. (2013). Immobilisation and application of lipasesin organic media. Chem. Soc. Rev., 42, 6406. <u>https://doi.org/10.1039/C3CS35446F</u>
- Al-Duri, B., y Yong, Y. P. (2000). Lipase immobilisation: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. In *Biochemical Engineering Journal*. 4(3), 207-215. <u>https://doi.org/10.1016/S1369-703X(99)00050-9</u>
- Ansorge-Schumacher, M. B., y Thum, O. (2013). Immobilised lipases in the cosmetics industry. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6475–6490. <u>https://doi.org/10.1039/c3cs35484a</u>
- Arroyo, M. (1998). Inmovilizacion de enzimas. Fundamentos, metodos y aplicaciones. Ars *Pharmaceutica*, *39*(2), 23–39.
- Barbosa, O., Torres, R., Ortiz, C., Fernandez-Lafuente, R. (2012). Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocolo n the properties o flipase
 B from Candida Antarctica. Process Biochemistry, 47, 1220-1227. http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.04.019
- Borrelli, G. M., y Trono, D. (2015). Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 16, Issue 9, pp. 20774–20840). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms160920774
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. In ANALYTICAL BIOCHEMISTRY (Vol. 72).
- Brzozowski, A., Derewenda, U., Derewenda, Z., Dodson, G. y Lawson, D. (1991). A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*, *351*, 491–494. <u>https://doi.org/10.1038/351491a0</u>
- Caetano, N., Mata, T., Martins, A., Felgueiras, M. (2017). New trwnds in energy production and utilization. Energy Procedia, 107, 7-14. <u>doi:10.1016/j.egypro.2016.12.122</u>
- Calero, J., Verdugo, C., Luna, D., Sancho, E. D., Luna, C., Posadillo, A., Bautista, F. M., y Romero, A. A. (2014). Selective ethanolysis of sunflower oil with Lipozyme RM IM, an immobilized Rhizomucor miehei lipase, to obtain a biodiesel-like biofuel, which

avoids glycerol production through the monoglyceride formation. *New Biotechnology*, *31*(6), 596–601. <u>https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.02.008</u>

- Camacho-Ruiz, M., Mateos-Días, J. (2015). A broad pH indicator-based spectrophotometric assay for true lipases using tributyrin and tricaprylin. Journal of Lipid Research. 56(5), 1057-1067. <u>https://doi.org/10.1194/jlr.D052837</u>
- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G., y Marty, A. (2012). Lipases: An overview. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 861, pp. 3–30). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_1
- Colla, L. M., Ficanha, A. M. M., Rizzardi, J., Bertolin, T. E., Reinehr, C. O., y Costa, J. A. V. (2015). Production and characterization of lipases by two new isolates of Aspergillus through solid-state and submerged fermentation. *BioMed Research International*, 2015. https://doi.org/10.1155/2015/725959
- Derewendat, Z. S., Derewenda, U., y Dodson, G. G. (1992). The Crystal and Molecular Structure of the Rhizmmaw miehei Triacylglyceride Lipase at 1.9 A Resolution. In J. Mol. Biol. 127(3), 818-839. https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90225-9
- Ericsson, D. J., Kasrayan, A., Johansson, P., Bergfors, T., Sandström, A. G., Bäckvall, J. E., y Mowbray, S. L. (2008). X-ray Structure of Candida antarctica Lipase A Shows a Novel Lid Structure and a Likely Mode of Interfacial Activation. *Journal of Molecular Biology*, 376(1), 109–119. <u>https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.10.079</u>
- Federación Nacional de Biocombustibles. (7 de febrero de 2022). Demanda Nacional de

 Biodiesel.

 <u>Biodiesel.htm</u>
- Fernandez-Lafuente, R., Armisén, P., Sabuquillo, P., Fernández-Lorente, G., y Guisán, J. M. (1998). Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chemistry and Physics of Lipids*, 93(1–2), 185–197. <u>https://doi.org/10.1016/S0009-3084(98)00042-5</u>
- Fernandez-Lopez, L., Bartolome-Cabrero, R., Rodriguez, M. D., Dos Santos, C. S., Rueda, N., & Fernandez-Lafuente, R. (2015). Stabilizing effects of cations on lipases depend on the immobilization protocol. RSC Advances, 5(102), 83868–83875. doi:10.1039/c5ra18344h
- Fernandez-Lopez, L., Rueda, N., Bartolome-Cabrero, R., Rodriguez, M. D., Albuquerque, T. L., dos Santos, J. C. S., … Fernandez-Lafuente, R. (2016). Improved immobilization and stabilization of lipase from Rhizomucor miehei on octyl-glyoxyl agarose beads by using CaCl 2. Process Biochemistry, 51(1), 48–52. doi:10.1016/j.procbio.2015.11.015

- Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., Cortés, E., Garcia, J., Fernandez-Lafuente, R., Guisan , J. (2001) One-Step Purification, Covalent Inmobilization, and Additional Stabilization of Poly-His-Tagged Proteins Using Novel Heterofunctional Chelate-Epoxy Supports. Biotecnology and Bioengineering, 76 (3), 269-276. https://doi.org/10.1002/bit.10019
- Fojan, P., Jonson, P. H., Petersen, M. T. N., y Petersen, S. B. (2000). *What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach*. http://www.rcsb.org.
- Ganjalikhany, M. R., Ranjbar, B., Taghavi, A. H., y Tohidi Moghadam, T. (2012). Functional motions of candida antarctica lipase b: A survey through open-close conformations. *PLoS ONE*, 7(7). <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040327</u>
- Gaschott, T., Steinhilber, D., Milovic, V., y Rgen Stein, J. (2001). Nutrition and Cancer Tributyrin, a Stable and Rapidly Absorbed Prodrug of Butyric Acid, Enhances Antiproliferative Effects of Dihydroxycholecalciferol in Human Colon Cancer Cells 1. In J. Nutr (Vol. 131). https://academic.oup.com/jn/article-abstract/131/6/1839/4686813
- González-Bacerio, J., Rodríguez Hernández, J., y del Monte Martínez, A. (2010). Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial Lipases: enzymes having the potential for developing immobilised biocatalysts by interfacial adsorption. In *Rev. Colomb. Biotecnol* (Vol. 1).
- Hernandez, K., Garcia-Verdugo, E., Porcar, R., y Fernandez-Lafuente, R. (2011). Hydrolysis of triacetin catalyzed by immobilized lipases: Effect of the immobilization protocol and experimental conditions on diacetin yield. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(6–7), 510–517. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.02.005
- Hirata, D. B., Albuquerque, T. L., Rueda, N., Sánchez-Montero, J. M., Garcia-Verdugo, E., Porcar, R., y Fernandez-Lafuente, R. (2016). Advantages of Heterofunctional Octyl Supports: Production of 1,2-Dibutyrin by Specific and Selective Hydrolysis of Tributyrin Catalyzed by Immobilized Lipases. *ChemistrySelect*, 1(12), 3259–3270. https://doi.org/10.1002/slct.201600274
- Hirata, D. B., Albuquerque, T. L., Rueda, N., Virgen-Ortíz, J. J., Tacias-Pascacio, V. G., y Fernandez-Lafuente, R. (2016b). Evaluation of different immobilized lipases in transesterification reactions using tributyrin: Advantages of the heterofunctional octyl agarose beads. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133, 117–123. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.08.008

- Kurtovic, I., Marshall, S. N., Zhao, X., y Simpson, B. K. (2009). Lipases from mammals and fishes. *Reviews in Fisheries Science*, 17(1), 18–40. https://doi.org/10.1080/10641260802031322
- Leoneti, A. B., Aragão-Leoneti, V., y de Oliveira, S. V. W. B. (2012). Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renewable Energy*, *45*, 138–145. <u>https://doi.org/10.1016/j.renene.2012.02.032</u>
- Lok, C. M. (1978). Versatile methods for the synthesis of mixed acid 1,2-diacylglycerols. In *Chemistry and Physics of Lipids* (Vol. 22).
- Lourinho, G., y Brito, P. (2015). Advanced biodiesel production technologies: novel developments. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 14, Issue 2, pp. 287–316). Kluwer Academic Publishers. <u>https://doi.org/10.1007/s11157-014-9359-x</u>
- Manrique Vergara, D., y González Sánchez, M. E. (2017). Ácidos grasos de cadena corta (ácido butírico) y patologías intestinales. In *Nutricion hospitalaria* (Vol. 34, pp. 58–61). <u>https://doi.org/10.20960/nh.1573</u>
- Mateo, C., Palomo, J., Fuentes, M., Betancor, L., Grazu, V., López-Gallego, F., Pessela, C.,
 Hidalgo, A., Fernández-Lorente, G., Fernandez-Lafuente, R., Guisán, J. (2006).
 Glyoxyl agarose: A full inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. Enzyme and Microbial Technology, 39, 274-280.
- Mehta, A., Bodh, U., y Gupta, R. (2017). Fungal lipases: a review. In *Journal of Biotech Research* (Vol. 8). http://www.led.uni-stuttgart.de
- Ortiz, C., Ferreira, M. L., Barbosa, O., dos Santos, J. C. S., Rodrigues, R. C., Berenguer-Murcia, Á., Briand, L. E., y Fernandez-Lafuente, R. (2019). Novozym 435: The "perfect" lipase immobilized biocatalyst? In *Catalysis Science and Technology* (Vol. 9, Issue 10, pp. 2380–2420). Royal Society of Chemistry. <u>https://doi.org/10.1039/c9cy00415g</u>
- Petkar, M., Lali, A., Caimi, P., Daminati, M. (2006). Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 39,83-90. <u>https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.01.034</u>
- Priji et al., P. (2016). MICROBIAL LIPASES PROPERTIES AND APPLICATIONS. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 6(2), 799–807. <u>https://doi.org/10.15414/jmbfs.2016.6.2.799-807</u>
- Reis, P., Holmberg, K., Miller, R., Leser, M. E., Raab, T., y Watzke, H. J. (2009). Lipase reaction at interfaces as self-limiting processes. *Comptes Rendus Chimie*, 12(1–2), 163– 170. <u>https://doi.org/10.1016/j.crci.2008.04.018</u>

- Rodrigues, A., Bordado, J. C., y dos Santos, R. G. (2017). Upgrading the glycerol from biodiesel production as a source of energy carriers and chemicals - A technological review for three chemical pathways. *Energies*, 10(11). <u>https://doi.org/10.3390/en10111817</u>
- Rodrigues, R. C., y Ayub, M. A. Z. (2011). Effects of the combined use of thermomyces lanuginosus and rhizomucor miehei lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. *Process Biochemistry*, 46(3), 682–688. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.11.013
- Rodrigues, R., Virgen-Ortíz, J., Dos Santos, J., Berenguer-Murcia, Á., Alcantara, A., Barbosa,
 O., Ortiz, C., Fernandez-Lafuente, R. (2019). Immobilization o flipases on hydrophobic
 supports: immobilization mechanism, advantages, problems and solutions.
 Biotechnology Advances. 37, 746-770.
 https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.003
- Skjøt, M., de Maria, L., Chatterjee, R., Svendsen, A., Patkar, S. A., Østergaard, P. R., y Brask, J. (2009). Understanding the plasticity of the α/β hydrolase fold: Lid swapping on the Candida antarctica lipase B results in chimeras with interesting biocatalytic properties. *ChemBioChem*, 10(3), 520–527. <u>https://doi.org/10.1002/cbic.200800668</u>
- Stránský, K., Zarevúcka, M., Kejík, Z., Wimmer, Z., Macková, M., Demnerova, K. (2007).
 Substrate specificity, regioselectivity and hydrolytic activity o flipases activated from Geotrichum sp. Biochemical Engineering Journal, 34, 209-216.
 https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.12.006
- Suescun, A., Rueda, N., dos Santos, J. C. S., Castillo, J. J., Ortiz, C., Torres, R., Fernandez-Lafuente, R. (2015). Immobilization of lipases on glyoxyl–octyl supports: Improved stability and reactivation strategies. Process Biochemistry, 50(8), 1211– 1217. doi:10.1016/j.procbio.2015.05.010
- Tacias-Pascacio, V. G., Peirce, S., Torrestiana-Sanchez, B., Yates, M., Rosales-Quintero, A., Virgen-Ortíz, J. J., y Fernandez-Lafuente, R. (2016). Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: Tuning their stability, activity and specificity. *RSC Advances*, 6(102), 100281–100294. https://doi.org/10.1039/c6ra21730c
- Takwa, M. (2010). Lipase specificity ans selectivity Engineering, kinetics and applied catalysis. [Tesis de docotorado, KTH Royal Instituteof Technology]. Digitala Vetenskapliga Arkivet.

- United States Patent (19) Buenemann et al. 54-PROCESS FOR PURIFYING CRUDE GLYCEROL. (1991).
- Uppenberg, J., Hansen, M. T., Patkar, S., y Jones, A. (1994). *The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from Candida antarctica.*
- Watanabe Takaaki, Shimizu Masao, y Sugiura Masakatsu. (2003). Optimization of reaction conditions for the production of DAG using inmobilized 1,3-regioespecific lipase Lipozyme RM IM. JAOCS, 80(12), 1201–1207.
- Werpy, T., y Petersen, G. (2004). Top Value Added Chemicals from Biomass Volume I-Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas Produced by the Staff at Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) National Renewable Energy Laboratory (NREL) Office of Biomass Program (EERE) For the Office of the Energy Efficiency and Renewable Energy. http://www.osti.gov/bridge

Apéndices

Apéndice A. Curva de calibración – método de Bradford

Empleando un gradiente de concentraciones de albumina de suero bovino desde 0.1 hasta 1 mg/mL se obtuvo la ecuación de la recta determinada mediante el anexo 1. Dicha ecuación permite cuantificar la proteína soluble en medio acuoso, según lo descrito por Bradford (Bradford M. M, 1976).



Apéndice a. Curva de calibración por el método de Bradford para cuantificación de proteínas solubles.

Con la ecuación se estima la carga de proteína (lipasa) inmovilizada por los diferentes soportes en función del tiempo dada la diferencia entre la cantidad de proteína inicial y la presente en el medio a posteriori la inmovilización.

Apéndice B. Actividad hidrolítica de los derivados versus p-NPB.

Derivado	Actividad volumétrica	Actividad [U/g soporte]
OC-CALB	1,08	0,054
OC-GLX-CALB	0,30	0,015
OC-RML	0,44	0,022
OC-GLX-RML	0,36	0,018

Apéndice b. Actividad de hidrolisis de p-NPB de los derivados preparados en laboratorio.

Dadas las condiciones descritas por el método 4.2.5. Se determinaron las actividades de los derivados obtenidos. Por la Tabla 1, se determinó que la OC-CALB muestra una actividad de 0,054 U/g de soporte, identificando así que es el derivado que presenta mayor actividad de

hidrolisis versus p-NPB. Continuando con el derivado de OC-GLX-CALB, que presenta una actividad de 0,015 U/g de soporte; se observa una disminución significativa en la actividad respecto al OC-CALB.

En cuanto a los derivados de RML, observamos que: el OC-RML y el OC-GLX-RML presentan una actividad similar, 0,022 y 0,018 U/g de soporte respectivamente.

Apéndice C Gradiente para análisis por RP-HPLC

Tiempo [min]	Agua [%]	Acetonitrilo [%]
0 – 5	95	5
5 – 10	90	10
10 – 15	80	20
15 – 20	70	30
20 – 25	65	35
25 – 30	65	35
30 – 33	60	40
33 – 35	40	60
35 – 40	30	70
40 – 48	30	70
48 – 50	0	100
50 – 55	0	100
55 – 60	95	5

Apéndice c. Gradiente de fase móvil para análisis por RP-HPLC.

Apéndice D Actividad volumétrica de los derivados enzimáticos

La actividad volumétrica de los derivados se determinó mediante la siguiente ecuación. Ecuación 4.

$$Av[U/mL] = \left(\frac{m}{(\varepsilon * b)}\right) * 1000 * \left(\frac{V_{ensayo}}{V_{enzima}}\right) * FD$$

Donde,

U= Cantidad de enzima necesaria para hidrolizar un mol de p-NPB en un minuto a 25°C.

m= Pendiente que se mide en el espectrofotómetro UV-Vis.

 ϵ = Es el coeficiente de extinción molar del buffer fosfato de sodio 25mM (5150 M⁻¹cm⁻¹)

b= Es el ancho de la celda (1 cm)

Vensayo= Volumen final en la celda de ensayo

V_{enzima}= Volumen de enzima adicionada

FD= Es el factor de dilución del extracto enzimático

Apéndice E Actividad de los derivados enzimáticos

La actividad de los derivados se expresó en unidades de actividad por gramo de soporte. Y está descrito mediante la siguiente ecuación.

Ecuación 5.

Actividad
$$\left[\frac{U}{g \ de \ soporte}\right] = Actividad \ volumetrica/(\frac{(10mg \ de \ derivado)}{0.5 \ mL \ de \ buffer})$$